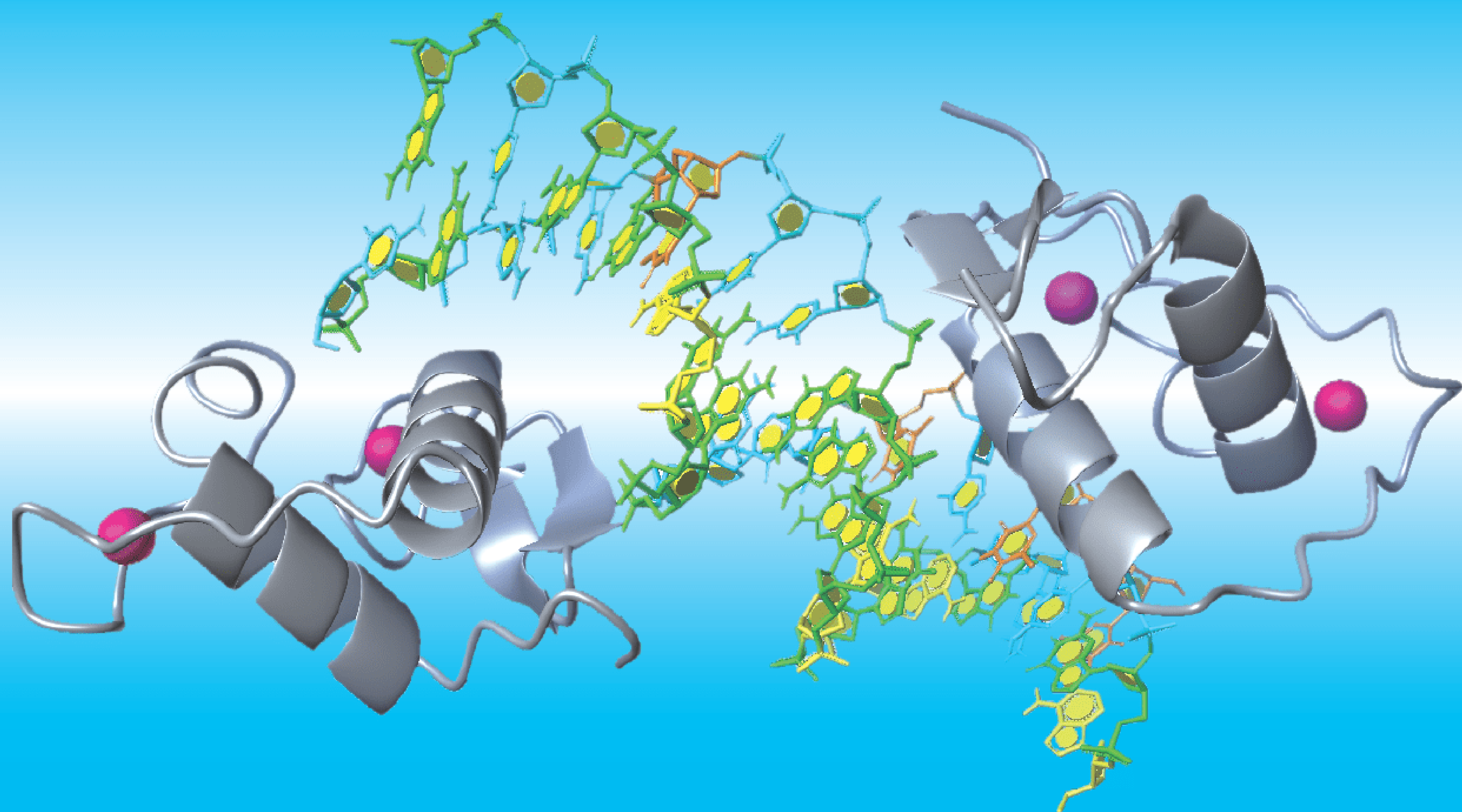
生物化学

（第4版）

王希成　编著



清華大學出版社

生 物 化 学

第 4 版

王希成　编著

清华大学出版社
北　京

内 容 简 介

《生物化学》第 4 版共分为 20 章，内容包括以蛋白质为主的生物分子的结构和功能，DNA 复制、转录和蛋白质合成等遗传信息的储存、传递和表达，以及糖代谢、电子传递和 ATP 合成、脂代谢和氨基酸代谢等内容，系统地阐述了生物化学的基本原理。

本书更新了许多"相关话题"，例如"利用基因重组技术生产的人蛋白质"、"基因'敲除'"、"柠檬酸循环与减肥"、"糖酵解与 PET"、"构建更有效的 Rubisco"和"ADA 缺乏的基因治疗"等。全书除第 1 章外，其余各章都附有习题，并且在书后附有解答。

本书供全国高等院校生命科学及相关专业学生使用。

图书在版编目（CIP）数据

生物化学/王希成编著.--4 版.--北京：清华大学出版社，2015
ISBN 978-7-302-41030-0

Ⅰ. ①生… Ⅱ. ①王… Ⅲ. ①生物化学 Ⅳ. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2015）第 169472 号

责任编辑：罗　健　王　华
封面设计：戴国印
责任校对：王淑云
责任印制：

出版发行：清华大学出版社
网　　址：http://www.tup.com.cn，http://www.wqbook.com
地　　址：北京清华大学学研大厦 A 座　　**邮　　编：**100084
社 总 机：010-62770175　　**邮　　购：**010-62786544
投稿与读者服务：010-62776969，c-service@tup.tsinghua.edu.cn
质量反馈：010-62772015，zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn
印 刷 者：
装 订 者：
经　　销：全国新华书店
开　　本：185mm×260mm　　**印　　张：**28.25　　**字　　数：**685 千字
版　　次：2015 年 12 月第 1 版　　**印　　次：**2015 年 12 月第1 次印刷
印　　数：1～　000
定　　价：　.00 元

产品编号：

前　　言

《生物化学》第4版编写的指导思想与前3版一致，目的是从学生的需求出发来介绍生物化学原理，为广大读者提供一本条理清晰、可读性强、利于教和学的生物化学教材。

第4版基本保留了第3版前20章条目，删去了第21章“激素与代谢调控”，新加了一些内容。例如，第7章的“信号转导”，第8章的“限制酶的应用”，第9章的“重组修复”和“转基因动物”，第11章的“新生多肽链的折叠”，第13章的“Entner-Doudoroff途径”和“糖酵解旁路——戊糖磷酸途径”，第15章的“糖原代谢的调控”和“糖异生的调控”，第16章的“质子势”，第17章的“植物中淀粉和蔗糖的合成”，第19章的“蛋白质的降解”等。

为拓展读者知识而设置的24个“相关话题”中的14个都是新选的。例如“加酶洗衣粉”、“利用基因重组技术生产的人蛋白质”、“基因‘敲除’”、“糖酵解与PET”、“柠檬酸循环与减肥”、“构建更有效的Rubisco”和“ADA缺乏的基因治疗”等。

全书有近500张图，为了增加可视性和更贴近主题，许多插图都进行了一定程度的修改，并新增了70多张图。这些图对熟悉和记忆生物分子结构、功能和代谢过程很有帮助。

本书除了第1章绪言没安排习题外，其余各章都附有习题(共208道)，其中许多是新选编的，书后附有解答。习题很有代表性，有一定难度。

本书有一定广度，基本原理论述清晰，很适合选作一学期生物化学教材。

虽然作者力争将错误率降至最低，但难免有疏漏和不足之处，竭诚欢迎广大读者批评、指正和提出建议。

王希成

2015年10月于清华园

(wangxic@mail.tsinghua.edu.cn)

目　　录

1 绪　　言

生物化学是一门力求在分子水平上描述生命物质的结构、组织和功能的学科。生命物质成分的化学结构是什么样的？这些成分之间是怎样相互作用形成有组织的超分子结构、细胞、多细胞组织和生物体的？为了存活，生命物质是怎样从它所处的环境中汲取能量的？为了生长和繁殖，一个生物体是怎样储存和传递遗传信息的？伴随着细胞和生物体的繁殖、老化和死亡，都发生了什么样的化学变化？这些都是生物化学家要面对的问题，解答这些问题将使人们透彻了解生命的化学本质，生物化学是所有生命科学的基础。

生物化学教材主要由三部分内容组成，本书是这样安排的：①结构化学，生物分子的结构及其生物功能与化学结构的关系（1～8 章）；②遗传生物化学，遗传信息的储存、传递和表达（9～11 章）；③新陈代谢，发生在生物体内的主要代谢反应（12～20 章）。

1.1　20 世纪的生物化学

生物化学以独立科学出现只是过去 100 年内的事，但在 20 世纪前，科学家已经做了许多生物化学的基础工作。例如在 18 世纪，对反应动力学和分子的原子组成等基本化学原理方面的了解就有了长足进步。而在 19 世纪末，生物体中产生的许多化学物质都已被鉴定。从那时起，生物化学就变成了一个有组织的学科，生物化学家阐明了许多生命化学过程。但生物化学快速发展大都发生在 20 世纪，它是一门年轻的现代科学。

在生物化学的历史上有两次重大突破：酶作为催化剂的作用和核酸作为信息载体分子的发现。

第一次突破是酶作为生物反应催化剂的作用被证实。1897 年 Eduard Buchner 的实验表明，使用酵母细胞磨碎后的提取液能够催化葡萄糖发酵生成乙醇（酒精）和二氧化碳，证明发酵是提取液中的酶在起作用。但在该研究之前，很多科学家一直认为只有活的酵母细胞才能催化这样复杂的生物反应。在接下来的 10 年中，研究发现许多其他代谢反应，反应途径也可在体外重现，而且能够确认催化每个反应的酶。

1926—1936 年，科学家先后制备了脲酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶结晶，证明酶是蛋白质。不过这一传统观念又在 1981 年被 S. Altman 和 T. C. Cech 的发现打破，他们发现一种具有酶功能的 rRNA 能够将内含子切掉，再将外显子拼接起来，他们将这样的 RNA 称为核酶。后来又发现了具有 DNA 连接酶活性的 DNA 片段，人们称它为脱氧核酶。所以，现在酶的定义应当是“酶是具有催化功能的蛋白质或核酸”。

第二次突破是核酸作为信息载体分子被证实，1944 年 Oswald Avery、Colin MacLeod 和 Maclyn McCarty 从致病的肺炎链球菌中提取了 DNA，然后将该 DNA 与非致病的肺炎

链球菌混合,结果非致病菌永久地被转化为致病菌。这个实验提供了决定性的证据:脱氧核糖核酸(DNA)是遗传信息的载体,但当时大多数生物化学家相信只有蛋白质能负载遗传信息,因为蛋白质足够复杂。

1953 年是个里程碑之年,Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构,并立刻意识到 DNA 能够自我复制,并将遗传信息传给下一代。就像 Crick 于 1958 年预言的那样,通常信息流会从核酸流向蛋白质,但不能反向流动。他认为由核酸向蛋白质的单方向流动为分子生物学的中心法则(图 1.1)。

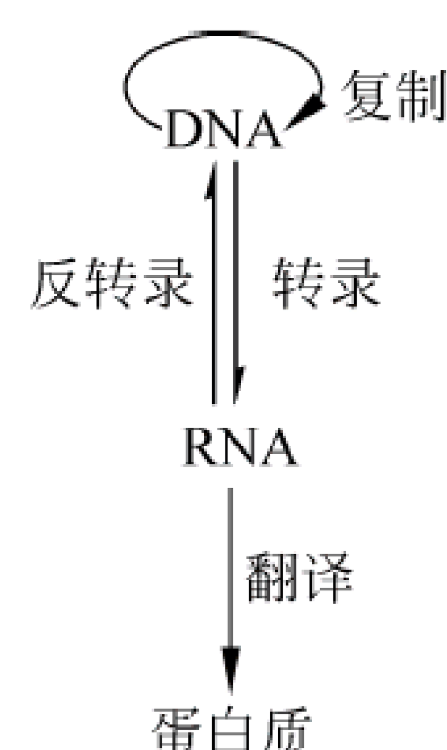


图 1.1　分子生物学的中心法则

DNA 双螺旋结构的发现是个里程碑,并由此推动了 20 世纪生物化学的飞跃式发展。

1963 年,在 Watson-Crick 文章发表之后 10 年,遗传密码被破译,mRNA 被发现,这是了解遗传信息表达的关键。

1973 年,第一个重组 DNA 分子被制造出来,打开了通向人类健康、农业、医学和环境科学的实际应用之门。

1985 年,科学家们已经懂得如何化学合成任一核酸片段和通过聚合酶链式反应扩增微量 DNA 片段,任何基因都可被克隆和突变,使得任何设想的变化都可整合到基因的结构中。

20 世纪 90 年代初,科学家们不仅知道怎样将一个新基因引入到植物和动物的种系中,而且也知道破坏或敲除一个已存在的基因,使得人们能够分析任何基因产物的代谢功能。

2001 年,公布了几乎完整的人类基因组核苷酸序列——DNA 的 2.9×10^9 碱基对,代表了 20 000 个以上的不同基因。

2002 年,科学界又发现了小的干扰 RNA(iRNAs)可以调控基因。基因组序列分析和基因受 RNA 调控在 21 世纪具有美好应用前景。

生物化学革命离不开生物新技术的开发。在双螺旋发现和人类基因组测序完成之间的半个世纪期间,正是生物化学和生物物理中强有力的新研究技术——X 射线晶体学、质谱、[核]磁共振、高分辨分离技术、蛋白质和核酸的自动测序和单个分子可视化等技术点燃引发了生物科学革命的。

1.2　生物化学的化学基础

有机化学研究碳和氢的化合物及它们的衍生物。因为生物细胞由碳化合物组成,所以,生物分子也是有机化学的一个主题。那么,有机化学家在实验室能制造出生命分子吗?一直到 19 世纪初,包括“出现在生物体中的物质不能在实验室生产”观点在内的“活力说”还被广泛地接受。然而在 1828 年德国化学家 Friedrich Whole 通过一个关键实验推翻了这一论点。他通过加热无机化合物氰酸铵(NH_4OCN)合成了人们熟悉的动物代谢废物尿素(H_2NCONH_2)。这个实验第一次表明生物体专有的化合物也能够由普通无机物质合成。后来的事实表明所有出现在生物体内的化合物,例如蛋白质与核酸等生物分子几乎都能在实验室合成,虽然某些情况下这样的合成即使对最精于合成的有机化学家也是一个相当大的挑战。

生物分子可按它们的官能团进行分类，并通过有机化学的方法加以描述。表 1.1 列出了生物化学常见的基本类型有机化合物和官能团。请注意其中的大多数官能团都含有氧和氮，两者都是电负性较强的元素。因此许多这样的官能团都是极性的，而它们的极性在它们的反应性中起着非常关键的作用。重要种类的生物分子都含有决定它们反应性质的特征官能团，将在描述这些生物分子时具体讨论这些官能团的反应特性。

表 1.1　生物化学中常见的官能团和键

化合物种类	结构通式	官能团和键
醇	ROH	$-\mathrm{OH}$　(羟基)
醚	ROR	$-\mathrm{O}-$　(醚键)
胺	$\mathrm{RNH_2}$　$\mathrm{R_2NH}$　$\mathrm{R_3N}$	$-\mathrm{N}\!<$　或　$-\overset{\vert}{\underset{\vert}{\mathrm{N}^{+}}}-$　(胺基)
硫醇	RSH	$-\mathrm{SH}$　(巯基)
醛	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-H}$	$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-}$　(羰基)
酮	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-R}$	$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-}$　(羰基)
羧酸	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-OH}$	$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-OH}$　(羧基)
酯	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-OR}$	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-}$　(酰基)　$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-O-}$　(酯键)
硫酯	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-SR}$	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-}$　(酰基)　$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-S-}$　(硫酯键)
酰胺	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-NR_2}$ $\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-NHR}$ $\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-NH_2}$	$\mathrm{R-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-}$　(酰基)　$\mathrm{-\overset{\overset{O}{\Vert}}{C}-\underset{\vert}{N}-}$　(酰胺键)
磷酸酯	$\mathrm{R-O-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-OH}$	$\mathrm{-O-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-OH}$　(磷酸基)　$\mathrm{-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-OH}$　(磷酰基)
二磷酸酯	$\mathrm{R-O-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-O-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-OH}$	$\mathrm{-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-O-\underset{\underset{OH}{\vert}}{\overset{\overset{O}{\Vert}}{P}}-OH}$　(磷酸酐基)

一些对于有机化学家来说极其重要的基团，如卤化烃和酰氯没有列在表 1.1 中，因为含有这些基团的分子在生物化学中很少出现。相反，虽然含碳的磷酸衍生物在有机化学的入门课程很少被提到，但是磷酸的酯和酸酐化合物在生物化学中却至关重要。例如三磷酸腺苷（ATP），一种作为细胞能量货币的分子既含有涉及磷酸的酯键，又含有酸酐键（图 1.2）。

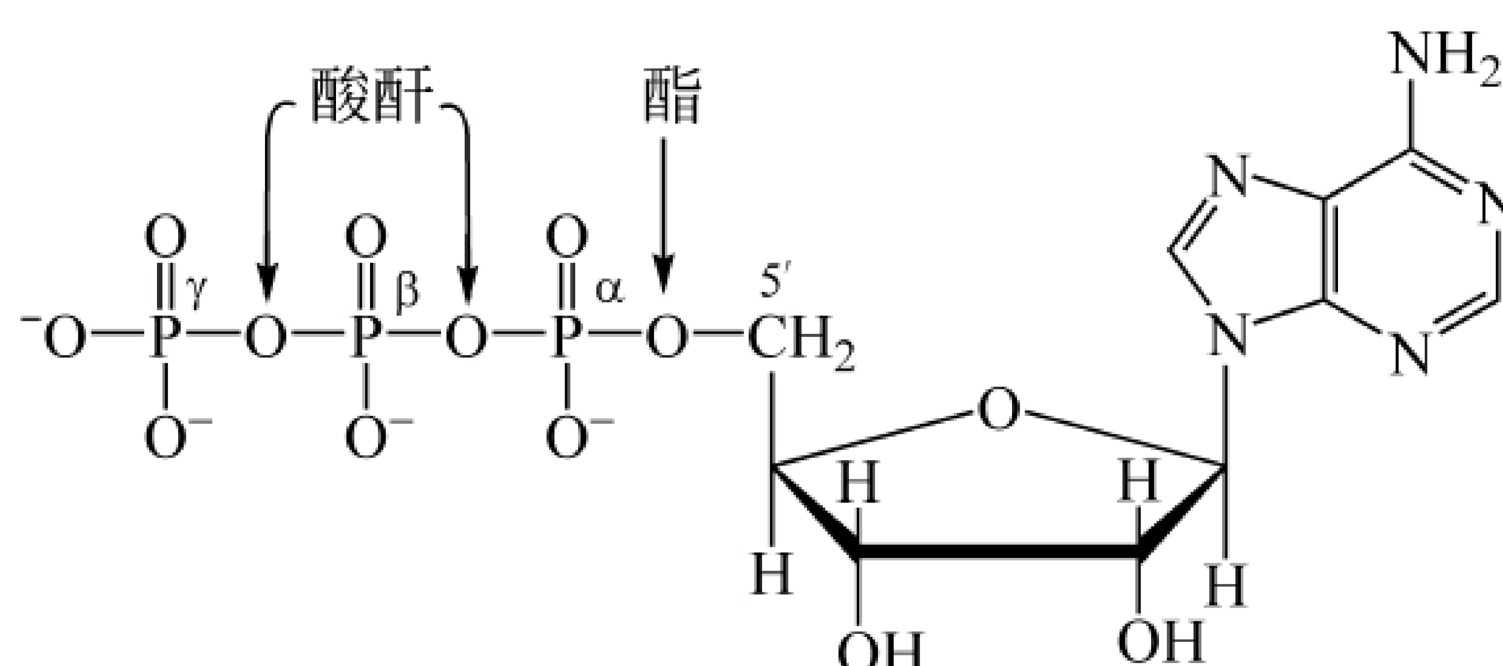


图1.2　ATP的结构

分子中存在2个酸酐键和1个酯键

1.3　生物分子

许多重要的生物大分子都是由构件聚合形成的聚合物,例如,蛋白质的构件是氨基酸,核酸的构件是核苷酸,多糖的构件大多为葡萄糖等,这些构件又称为单体。由单体形成聚合物需要进行连续多步的缩合反应,整合到聚合物的单体常被称为残基。有的聚合物是由一种单体聚合形成的,像一些多糖就是由单一葡萄糖残基聚合的产物,而像蛋白质和核酸那样的生物大分子则是由不同种类残基按照特定顺序聚合的产物,残基的序列决定它的功能。

1.3.1　蛋白质

蛋白质的构件是氨基酸,所有细胞蛋白质基本上都是由20种标准氨基酸组成的。所有氨基酸都至少含有两个功能基团——出现在α碳上的一个氨基和一个羧基,氨基酸之间的差别主要表现在侧链(R)上。图1.3中的二肽就是由一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基缩合形成的。蛋白质就是氨基酸的聚合物,自然界中发现的各种各样的蛋白质,它们的氨基酸组成和排列顺序都不同。蛋白质的功能取决于它的三维结构,而三维结构又是由它的氨基酸序列确定的,当然氨基酸的序列最终是由基因编码的。蛋白质分为纤维蛋白,如构成毛发的角蛋白,以及具有催化功能和其他功能的球蛋白。

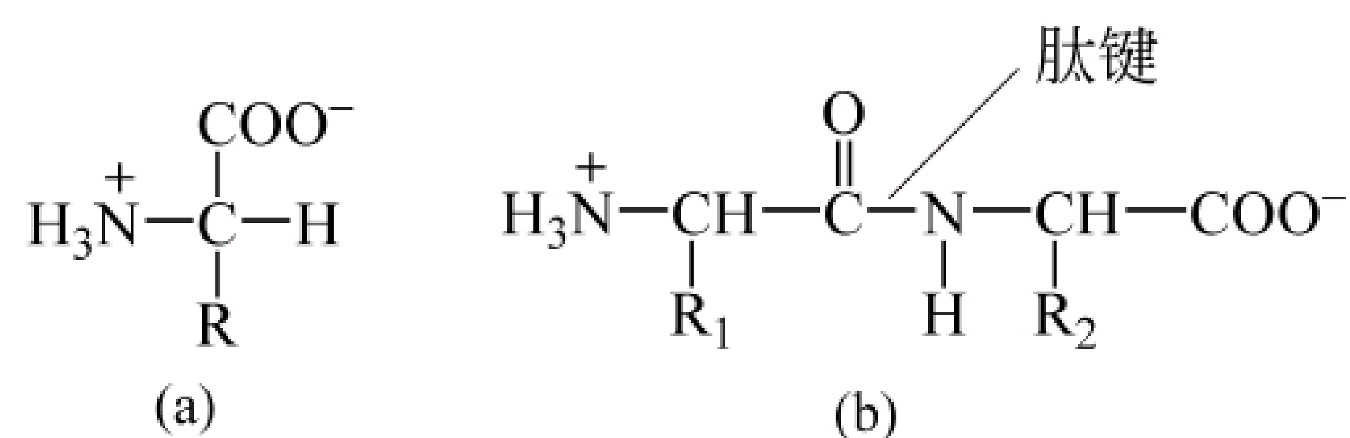


图1.3　氨基酸结构和二肽

(a)氨基酸含有一个氨基和一个羧基,不同氨基酸含有不同的侧链(R);(b)二肽是由两个氨基酸之间反应形成肽键生成的

1.3.2　核酸

核酸是由核苷酸的单体组成的大分子,在核酸一章将会看到核苷酸含有一个核糖或脱氧核糖、一个含氮的杂环碱基和至少一个磷酸基团。核苷酸中的碱基是嘌呤和嘧啶碱基。出现在DNA中的碱基有腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T);出现在RNA中的碱基有腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。在核酸分子中,核苷酸之间

通过磷酸二酯键共价连接，共价连接的核苷酸称为核苷酸残基(图 1.4)。

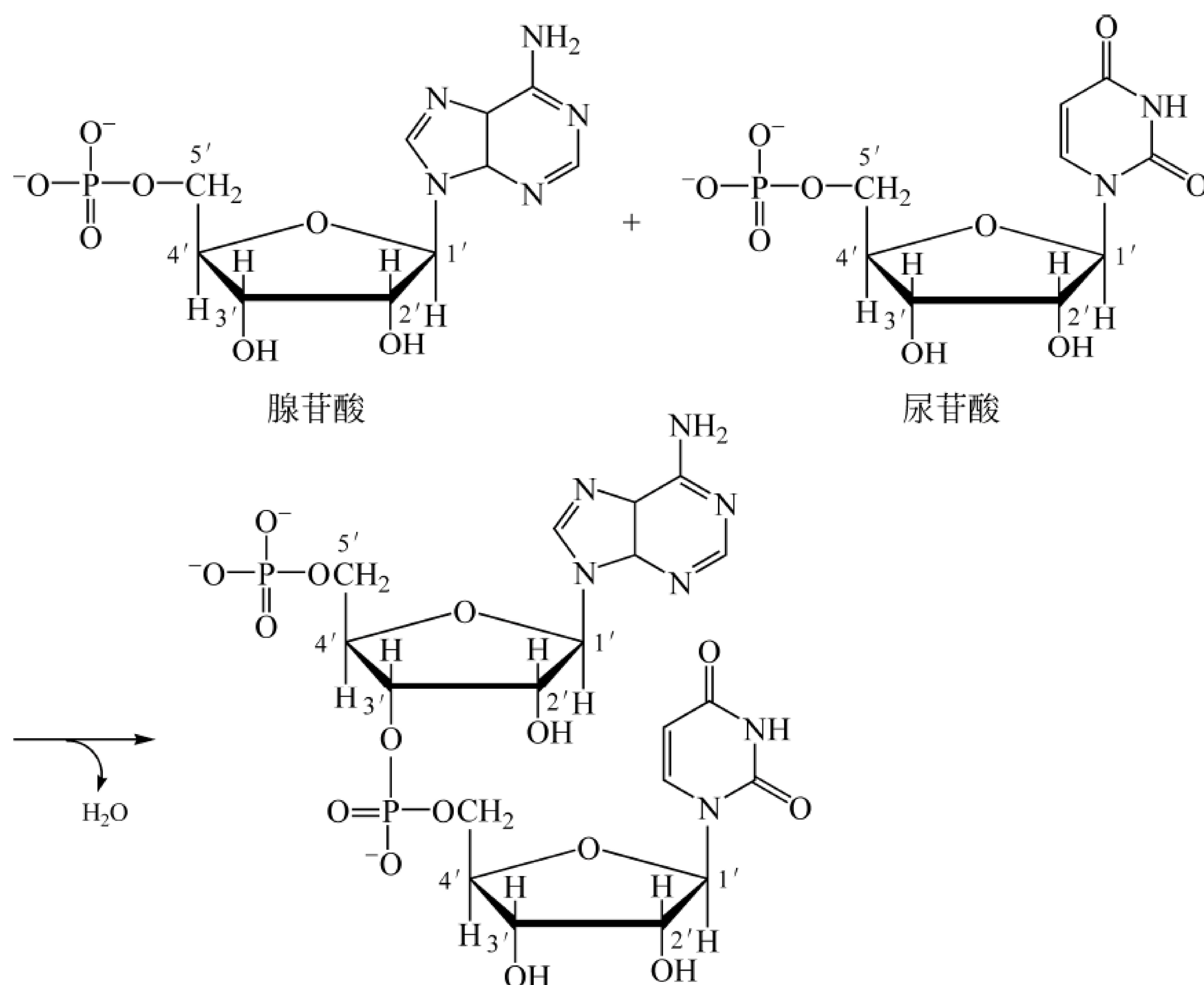


图 1.4　二核苷酸的生成

两个核苷酸通过形成磷酸二酯键生成二核苷酸

在 DNA 分子中两条核苷酸链的碱基以互补配对的方式相互作用，A 与 T 配对，而 G 与 C 配对，整个 DNA 分子形成一个螺旋结构，特定的碱基序列负载着遗传信息。有些核酸分子很大，例如人的一些染色体含有 1 亿以上核苷酸残基的 DNA 分子。但细菌含有的基因比哺乳动物少，通常含有小的、环状的 DNA 分子。

RNA 是从 DNA 中一条模板链转录而来的单链聚核苷酸。主要存在着三种类型 RNA，包括直接将来自 DNA 的信息转移给蛋白质的信使核糖核酸(mRNA)、专门负载用于蛋白质合成的特定氨基酸的转移核糖核酸(tRNA)和组成蛋白质合成机器的核糖体核糖核酸(rRNA)。DNA 中的基因信息经转录形成成熟的 mRNA，然后进入 rRNA 和蛋白质复合物核糖体，通过 tRNA 上的反密码子识别 mRNA 上的三联体密码子，并将 tRNA 负载的特定氨基酸转移到延伸的肽链上，可以说蛋白质是通过依次解读 mRNA 上的密码子合成的。

1.3.3　多糖

糖主要是由碳、氢和氧组成的，包括简单的单糖、多糖和其他的糖衍生物。单糖和多糖的残基一般都含有几个羟基，因此也被称为多元醇。大多数常见的单糖含有 5 个或6 个碳原子，最常见的五碳糖是核糖，核糖是核糖核酸(RNA)的糖成分，而出现在脱氧核糖核酸(DNA)中的是 2′-脱氧核糖。葡萄糖是常见的六碳糖。

葡萄糖是储存多糖糖原和淀粉及结构多糖纤维素的构件分子。在这些多糖中，每一个葡萄糖残基的 C-1 都是与下一个葡萄糖残基的 C-4 羟基形成糖苷键(图 1.5)。不过淀粉和

糖原与纤维素之间的糖苷键不同,前者形成的是可被淀粉酶降解的α(1→4)糖苷键,而纤维素形成的是可被纤维素酶降解的β(1→4)糖苷键。纤维素是地球上最丰富的生物聚合物。结构多糖除了纤维素外还有几丁质和糖胺聚糖,这些内容将在第6章中详述。

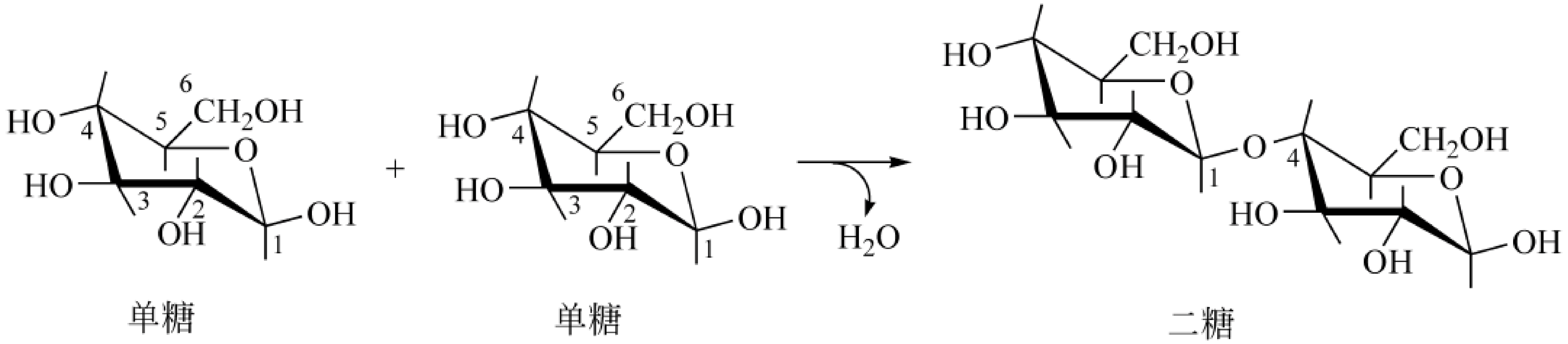


图1.5　二糖的生成

二糖是由一个单糖的C-1与另一个单糖的C-4通过形成糖苷键生成的

多糖还包括称为复合糖的蛋白聚糖、肽聚糖和糖蛋白,其中的糖成分大多为杂多糖。复合糖在细胞之间的相互识别、黏附、发育过程中的细胞迁移、血液凝固、免疫反应和愈伤过程中发挥着重要的作用。

1.3.4　脂和生物膜

脂是一类定义为不溶于水的有机分子化合物。某些脂是储能分子,某些脂是膜的结构成分,还有些脂参与细胞内和细胞之间的通讯。最简单的脂是脂肪酸,它是带有羧基的长的碳氢链。生物体内游离的脂肪酸含量很少,大都以三酰甘油(或称为脂肪)和甘油磷脂的化合物形式出现在生物体内。三酰甘油是哺乳动物中最丰富的一类脂,由一分子甘油与三分子脂肪酸通过酯键构成的。而甘油磷脂是甘油-3-磷酸与两个脂肪酸形成的磷酸酯,通常磷酸还共价连接着一个极性头(例如乙醇胺)(图1.6)。

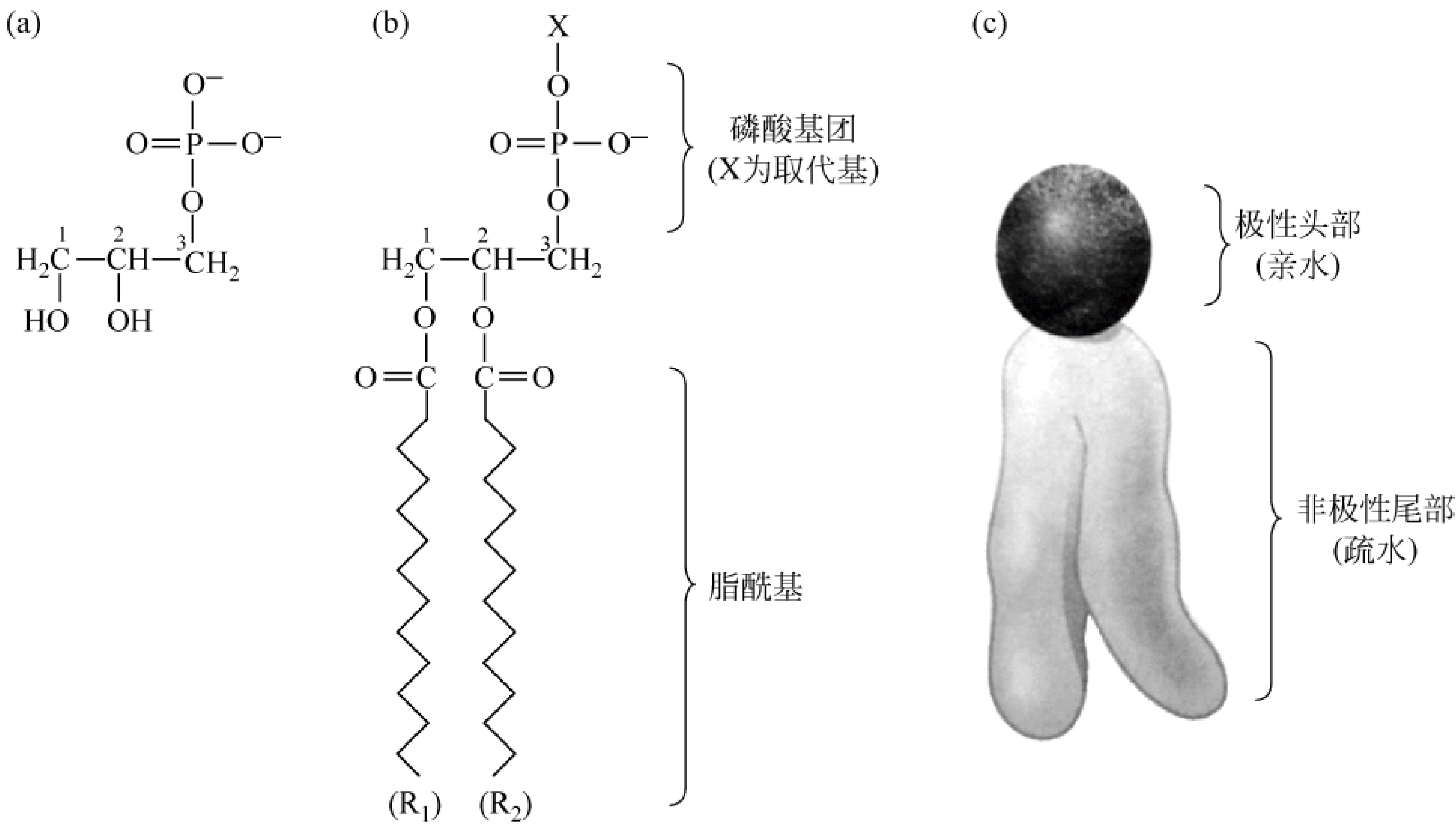


图1.6　磷脂结构

(a) 甘油-3-磷酸;(b) 甘油磷脂,两个非极性脂肪酸链通过酯键连接到甘油-3-磷酸上,X为磷酸基团的取代基;(c) 以磷脂为代表的膜脂模型,分子由一个极性头和一个非极性尾(两个脂酰基)构成

由于磷脂既连有疏水的脂肪酸链，又连有极性头，所以磷脂是个两性脂，是生物膜的主要成分。生物膜是由以磷脂为主的膜脂构成的脂双层，脂双层构成了所有生物膜结构的基础。生物膜将细胞或细胞内的区室与周围的环境隔离开，大多数生物膜都含有镶嵌在膜内或附着在膜上的蛋白质。某些膜蛋白可以形成营养物质进入或废物排出的通道，而有些膜蛋白可以催化发生在膜表面的特异反应。

1.4 生命的基本单元——细胞

维持生命活动的绝大多数反应都发生在细胞内。细胞是生命组织的基本单位，所以讲到生物分子的功能及这些分子代谢的反应都离不开细胞，因此有关细胞结构和功能的基本知识对于学好生物化学也是非常重要的。

1.4.1 细胞的分子组织层次

图 1.7 给出了阶梯式的细胞分子组织层次。形成生物分子的主要前体是 H_2O、CO_2 和 3 种无机氮化合物——氨(NH_3)、硝酸盐(NO_3^-)和氮气(N_2)。

第一步，无机前体转化为代谢物——简单的有机化合物(如丙酮酸和柠檬酸等)。这些化合物是细胞能量转换和各类构件合成中的中间物，由它们可合成氨基酸、糖、脂肪酸和甘油。这些构件可通过共价键形成大分子，如蛋白质、多糖、多核苷酸(DNA 和 RNA)和脂质(严格地讲脂质含有很少构件，确实不像其他大分子多聚物)。

然后，大分子内相互作用产生下一个水平的结构组织：超分子复合物。一类或多类大分子的不同成员聚集形成具有重要亚细胞功能的特化组合体(靠非共价键维持)，例如核糖体、染色体、细胞骨架和多功能酶。从图 1.3 看到在细胞的阶梯式分子组织中，细胞器占据了下一个高台阶，但细胞器只出现在真核细胞中，例如细胞核、线粒体、叶绿体、内质网、高尔基体、液泡及其他相对较小的过氧化物酶体和溶酶体等。最终细胞器等原生质体在膜包裹下形成了生命的基本单元——细胞。

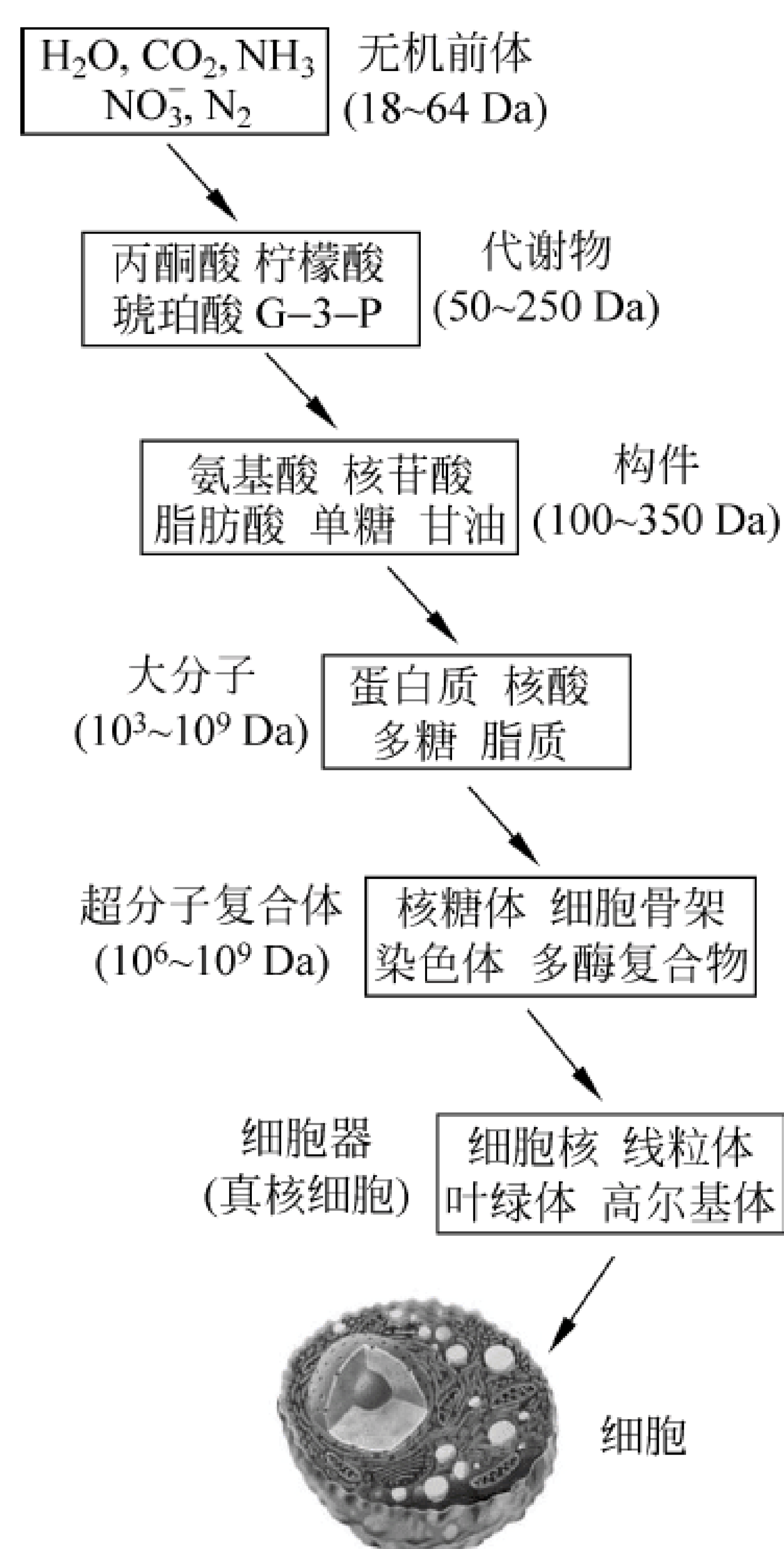


图 1.7 细胞的分子组织层次

生物分为原核生物和真核生物两大类，原核生物包括各种各样的细菌。真核生物包括原生生物、真菌、植物和动物。绝大多数真核生物为多细胞生物，但也包括单细胞生物，如酵母菌和草履虫。

1.4.2 原核细胞

单细胞原核生物细菌的染色体是一个环状 DNA 分子，细胞中没有细胞核，但有一个拟核区，没有其他细胞器，通常将这类细胞称为原核细胞(prokaryocyte)(图 1.8)。

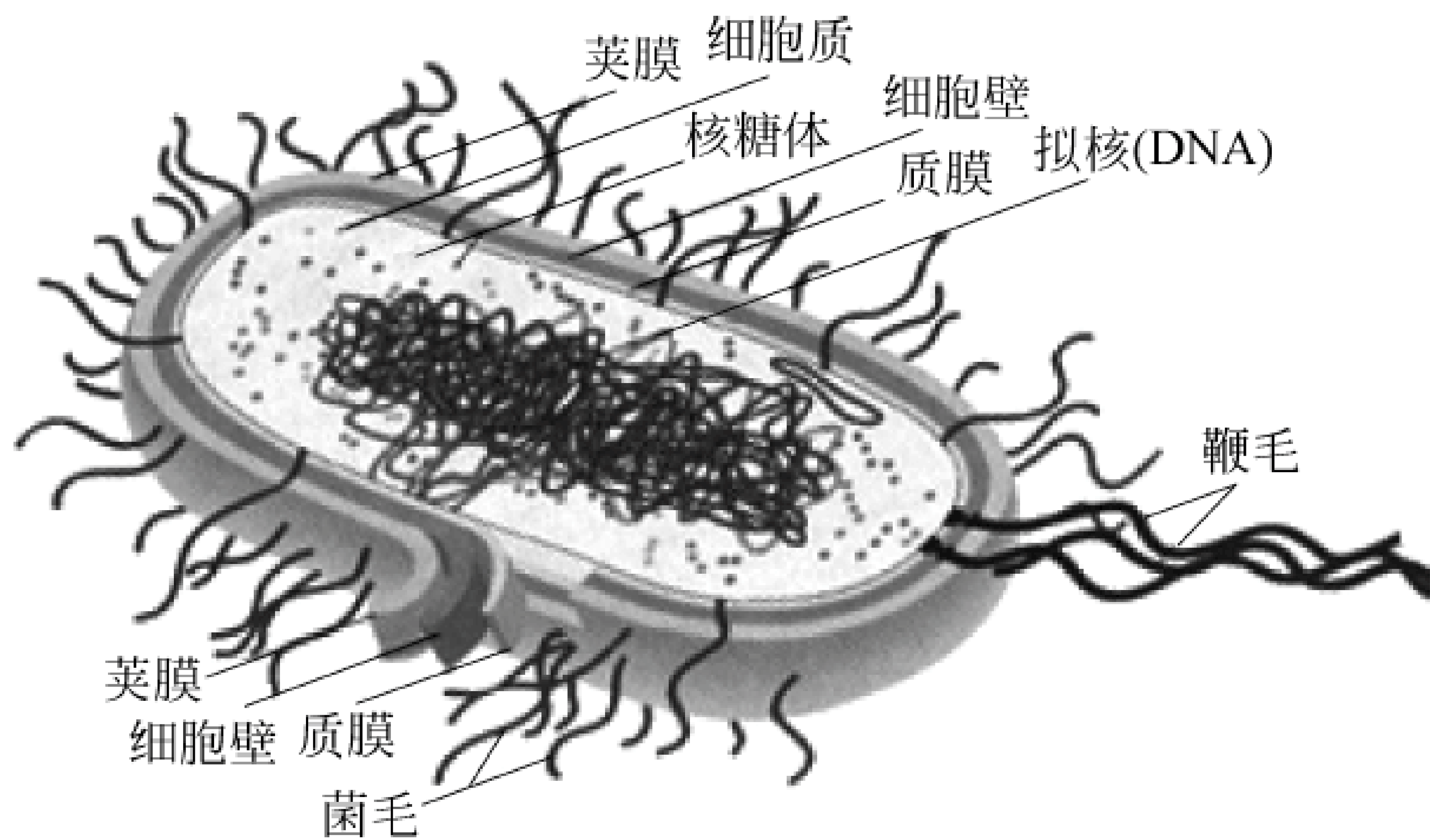


图1.8 原核细胞

从图1.8中可看到,虽然原核细胞中没有膜包被的细胞核,但有一个DNA集中的拟核区,一个原核细胞至少含有一个拟核区。拟核区中封闭的环状DNA分子就是原核细胞的基因组,黏附在细胞膜上。原核细胞分裂前,DNA自我复制,两个环状DNA分子都与质膜相连接。细胞分裂时两个子细胞分别得到DNA的一份拷贝。

在一个原核细胞中,拟核区外的细胞质中含有许多呈小颗粒状的核糖体。这些核糖体中含有RNA和蛋白质,因此又被称为核蛋白颗粒,它们是蛋白质合成的场所。

每一个原核细胞外都有一层与外面环境相隔绝的细胞膜,又叫作质膜系统,它是由脂分子和蛋白质分子组成的集合体。除了细胞膜外,在细胞膜外面,原核细菌还有一层细胞壁,主要是由多糖组成的,对细胞起保护作用,这个特点有点像植物细胞。

1.4.3 真核细胞

真核生物的细胞与原核细胞相比,在结构层次上要复杂得多,细胞内有膜包被的细胞核及许多具膜的细胞器,例如线粒体、高尔基体,以及由DNA分子、组蛋白和其他蛋白质等组成染色体,人们将具备这样特征的细胞称为真核细胞(eukaryocyte)。图1.9给出了典型的动物细胞与植物细胞的细胞结构。

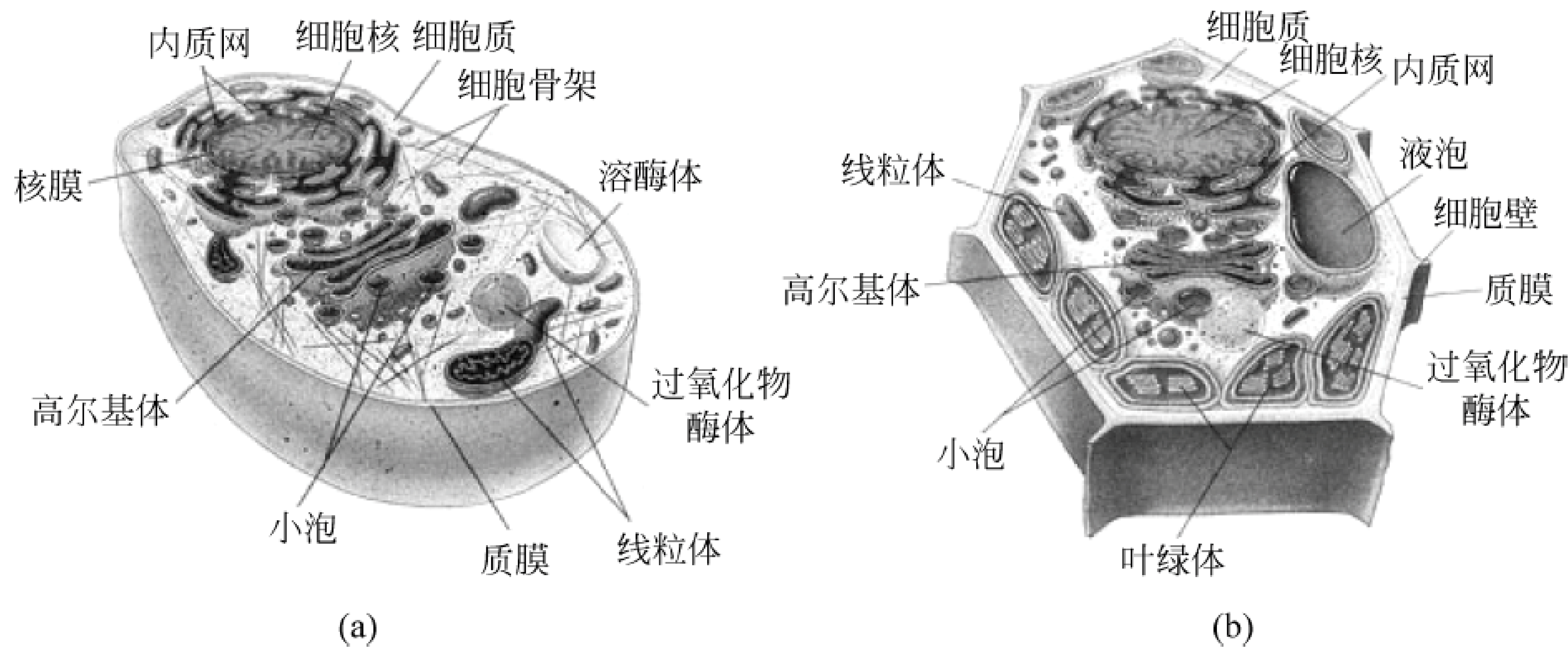


图1.9 细胞结构

(a) 动物细胞;(b) 植物细胞

1. 细胞核

除了哺乳动物血液中的红细胞和维管植物的筛管细胞没有细胞核之外，其他所有真核细胞都含有一个由核被膜界定的细胞核。核被膜由两层膜组成，外层膜延伸与细胞质中糙面内质网相连，外膜上分布着许多核糖体颗粒。细胞核中有一个富含 RNA 的核仁。除了线粒体和叶绿体中一小部分 RNA 之外，细胞中 RNA 都是在核仁中合成，然后通过核被膜上的核孔运输到细胞质的核糖体。核仁中存在着由 DNA 和 RNA 组成的染色质。跟原核细胞一样，真核细胞中主要的基因组（它的核 DNA）在细胞分裂前被复制，两份 DNA 拷贝被平均分配到两个子代细胞中。

2. 线粒体

第二个非常重要的真核细胞器是线粒体，像细胞核一样，它也是双层膜包被的细胞器。外层膜的表面相当光滑，但是内膜向内折叠形成许多凸出的称为嵴的褶皱，嵴使内膜表面积增加，有利于氧化磷酸化反应进行。许多负责催化重要反应的酶分布在线粒体内膜上。线粒体被称为有机体的“发电厂”，在线粒体中发生的氧化反应为细胞提供大量能量。

线粒体基质中还含有 DNA 分子和核糖体，有一套自己的遗传体系。线粒体与细菌大小相近，DNA 分子也是环状的，人们推测它们有可能来自于被真核细胞吞噬的好氧细菌。

3. 内质网

内质网是由一个连续的单位膜形成的小管、小囊或扁囊（也称为膜层或潴泡）构成的内腔连通的连续网状膜。内质网分为糙面内质网与光面内质网两种类型。糙面内质网上镶嵌了许多核糖体，核糖体（也有一部分分布在细胞质中）是蛋白质合成、修饰加工、转运或输出的场所。另外，糙面内质网也是制造许多细胞器，如高尔基体、溶酶体及内质网和质膜的膜蛋白和磷脂的工厂。但光面内质网上没有核糖体，广泛存在于可以合成类固醇的细胞中，例如精巢的间质细胞、肾上腺皮质及其他分泌激素的细胞等。

4. 叶绿体

叶绿体是只有绿色植物才有的重要细胞器。叶绿体的外被是双层膜，内部有一个悬浮在基质中的复杂的膜系统。膜系统由一摞一摞的称为类囊体的扁平囊组成，一摞扁平囊（10～50）组成一个基粒，各基粒之间有埋在基质中的基质类囊体相连。光合作用色素和电子传递体都位于类囊体膜中。叶绿体和线粒体一样，拥有与核内 DNA 不同的环状 DNA 和核糖体，可以合成叶绿体中的部分蛋白质。

5. 其他细胞器和细胞组成

高尔基体由一些（4～8 个）堆积排列的具有光滑膜的扁平囊和一些小泡组成。高尔基体被看作是细胞中蛋白质，特别是糖蛋白合成、加工、储存和转运中心，对分泌的糖蛋白具有修饰及转运作用。

溶酶体是一类由单层光滑膜包被的小泡，泡内含有多达 60 种的酸性水解酶，其中包括蛋白酶、核酸酶、糖苷酶、脂酶、磷酸酶、硫酸酯酶和磷脂酶等。这些酶在酸性条件（最适 pH 为 5.0）下能够将溶酶体吞入的蛋白质、核酸、多糖和脂类等生物大分子及细胞中失去功能的细胞结构碎片降解。

过氧物酶体是一个由单位膜包裹的卵圆形或圆形小体。过氧物酶体含有多种氧化酶，例如 *L*-氨基酸氧化酶、尿酸氧化酶（人类、鸟类等过氧物酶体不含）及催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 的过氧化氢酶等。各种氧化酶有一个共同特征：在氧化底物过程中，氧化酶使

氧还原为过氧化氢,然后过氧化氢酶再将过氧化氢还原为水和氧。

乙醛酸循环体是存在于植物细胞中的一种细胞器,含有催化乙醛酸循环的酶。乙醛酸循环可将某些脂类转化为糖类,乙醛酸是乙醛酸循环的中间体。

细胞膜是由脂双层及镶嵌在上面的多种蛋白质构成的,主要功能是将其与外界环境相隔绝。质膜和所有生物膜都有选择透性,一些物质很容易通过膜,而大部分物质不能通过。但膜上的一些膜转运蛋白质可将特定的物质转运过细胞膜,进入细胞内。

植物细胞(以及藻类)的细胞膜外还含有细胞壁。植物细胞壁中的纤维素是植物的主要组成成分;木材、棉花、亚麻还有大多数品种的纸张中主要含有纤维素。

植物细胞中还含有位于细胞中央的巨大的液泡,液泡是一种位于细胞质中由单层膜包被的充满稀溶液的囊泡,其中溶有无机盐、氨基酸、糖类和包括花色素苷在内的各种色素。液泡的一个重要功能就是将那些大量产生不能及时排出的毒性代谢物质与细胞中其他物质相隔绝。这些代谢产生的废物可能有强烈异味,甚至有足够的毒性,可降低食草动物的食欲。

2　氨基酸和蛋白质一级结构

蛋白质(protein)是生物体内主要的生物分子,因生物种类的不同,其蛋白质的种类和含量有很大的差别,例如人体内约含有 30 万种蛋白质,一个大肠杆菌(*E. coli*)的蛋白质含量虽少,但也含有 1000 种以上。整个生物界有 10^{10}～10^{12} 种蛋白质。但无论是人体内蛋白质,还是 *E. coli* 中蛋白质,主要由 20 种氨基酸(amino acid)构成,即这 20 种氨基酸是生物界通用氨基酸,是蛋白质的构件分子,常称为标准氨基酸。

2.1　氨基酸结构和分类

蛋白质是由氨基酸构成的聚合物,所有生物都是利用这 20 种标准氨基酸作为构件组装成各种蛋白质分子。尽管氨基酸的种类有限,但由于氨基酸在蛋白质中连接的次序及氨基酸数目的不同,可以组装成几乎无限的不同种类的蛋白质。

2.1.1　氨基酸结构

图 2.1 给出了两种氨基酸通式的表示方法,全质子化形式的氨基酸可以看作一个二元弱酸。如果处于生理条件下,氨基质子化($-\overset{+}{N}H_3$),而羧基离子化($-COO^-$),氨基酸是个兼性离子,或称为偶极离子。而如果将一个氨基酸描述成带有$-COOH$ 和$-NH_2$ 基团的形式是不合适的,因为不存在一个保证两个基团都存在的 pH。

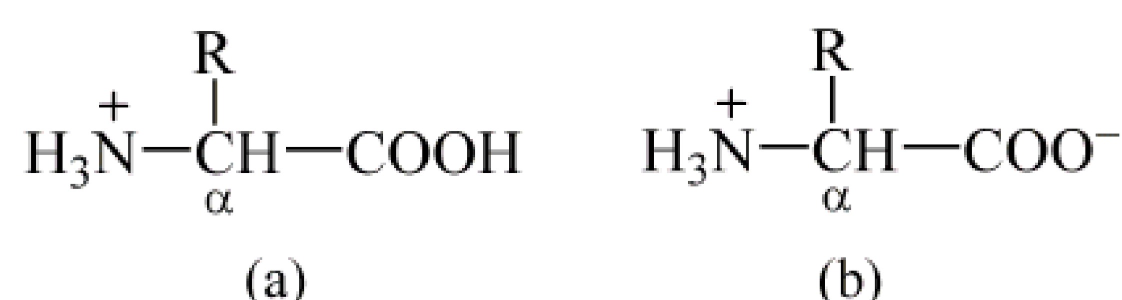


图 2.1　氨基酸通式

(a) 氨基酸的全质子化形式;

(b) 氨基酸的兼性离子形式

由于氨基酸分子中的 α-碳(分子中第二个碳,表示为 C_α)结合着一个氨基和一个酸性的羧基,所以 20 种氨基酸都被称为 α-氨基酸。此外,C_α还结合着一个 H 原子和一个侧链基团(用 R 表示)。如果与 C_α共价连接的侧链 R 不是 H 原子,则 C_α就结合了 4 种不同的基团,此时 C_α称为不对称碳原子(也称为手性碳原子、不对称中心或手性中心),含有一个不对称碳原子的氨基酸就存在着两种不能叠合的镜像立体异构体。

为了与立体化学参照化合物 *L*-甘油醛或 *D*-甘油醛比较,按照惯例将氨基酸的 α-COO^- 画在垂直方向的顶端,侧链 R 画在底端,α-$\overset{+}{N}H_3$ 处于 C_α左侧为 *L*-氨基酸,α-$\overset{+}{N}H_3$ 处于 C_α右侧为 *D*-氨基酸(图 2.2)。到目前为止,发现的游离的氨基酸和蛋白质中的氨基酸残基都是 *L* 型氨基酸。

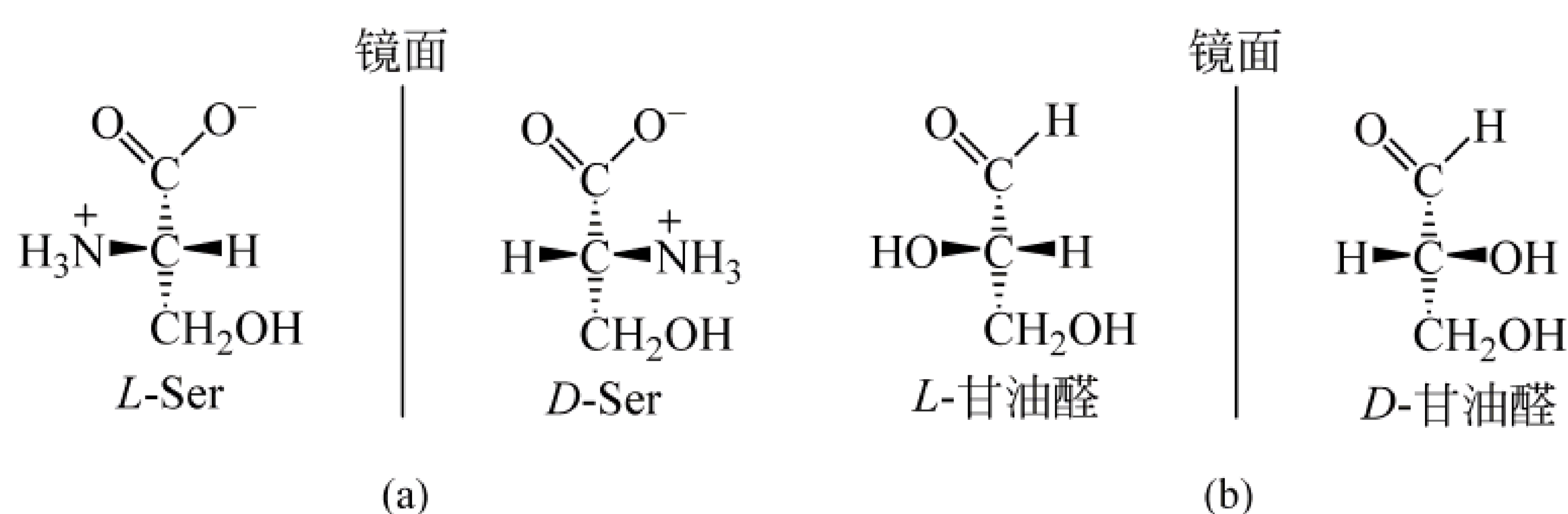


图 2.2 *L*-Ser 和 *D*-Ser 透视式

(a) *L*-Ser 和 *D*-Ser 透视式;(b) *L*-甘油醛和 *D*-甘油醛透视式

手性碳原子处于纸面内,实的楔形键凸出纸面,朝向读者;而虚的楔形键伸向纸面后,背离读者

相关话题 利用氨基酸外消旋化确定化石的年代

氨基酸能够自动地由 *D* 型转换为 *L* 型,反之亦然。通常消旋反应进行得非常慢,但如果处于高温下反应会加快。例如,在 100℃ 下 *L*-天冬氨酸转换为 *D*-天冬氨酸的半衰期为 30 天,而在 37℃ 下约为 350 年,18℃ 下约为 50 000 年。

哺乳动物的牙珐琅质的氨基酸组成常被用于确定一个化石的年代,当然需要知道或能够估计出来那个时期环境的平均温度。开始合成氨基酸时它们绝对都是 *L* 型的。随着时间的推移,*D* 异构体的量增加,能够非常精确地测出 *D*/*L* 比例。通过测定氨基酸外消旋化确定化石年代的方法现在已经被更可靠的方法(如测定 $^{14}C/^{12}C$ 或 $^{238}U/^{235}U$ 的比例)替代。

研究发现一些生物含有特殊的催化 *L* 型和 *D* 型氨基酸相互转换的消旋酶。例如,细菌含有将 *L*-丙氨酸转换为 *D*-丙氨酸的丙氨酸消旋酶,这些酶每秒能够催化上千个反应。

2.1.2 氨基酸分类

从图 2.1 可看出,每一种氨基酸的侧链(R)都是不同的。由于侧链不同导致氨基酸的带电状态和化学性质也不一样。按照侧链基团在 pH7.0 条件下表现出的极性可以把 20 种氨基酸归纳为 4 组:非极性氨基酸、极性不带电荷氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸。

1. 非极性氨基酸(8 种)

非极性氨基酸(nonpolar amino acids)也称为疏水性氨基酸,包括丙氨酸(α-氨基丙酸)、缬氨酸(α-氨基异戊酸)、亮氨酸(α-氨基异己酸)、异亮氨酸(α-氨基-β-甲基戊酸)、苯丙氨酸(α-氨基-β-苯丙酸)、色氨酸(β-吲哚-α-氨基丙酸)、蛋氨酸(α-氨基-γ-甲硫基丁酸)和脯氨酸(β-吡咯烷基-α-羧酸)(图 2.3)。脯氨酸明显地不同于其他 19 种氨基酸,是自身的侧链取代了 α-氨基的一个氢后形成的产物,所以严格讲脯氨酸是一种 α-亚氨基酸。

2. 极性不带电荷氨基酸(7 种)

极性不带电荷氨基酸包括甘氨酸(α-氨基乙酸)、丝氨酸(α-氨基-β-羟基丙酸)、苏氨酸(α-氨基-β-羟基丁酸)、半胱氨酸(α-氨基-β-巯基丙酸)、天冬酰胺(β-氨基-β-羧基丙酰胺)、谷氨酰胺(γ-氨基-γ-羧基丁酰胺)和酪氨酸(α-氨基-β-对羟基苯丙酸)(图 2.4)。

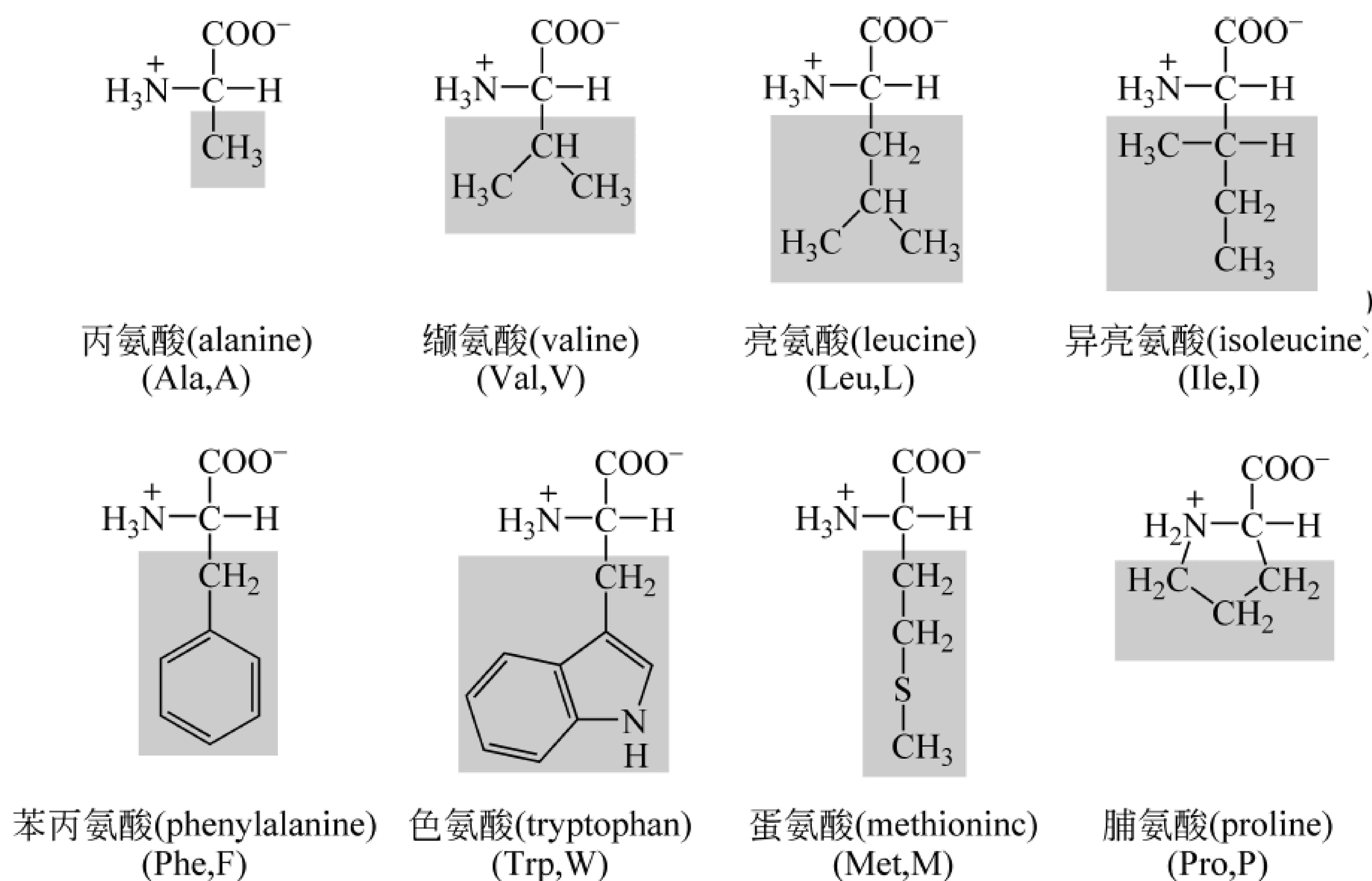


图 2.3 非极性氨基酸

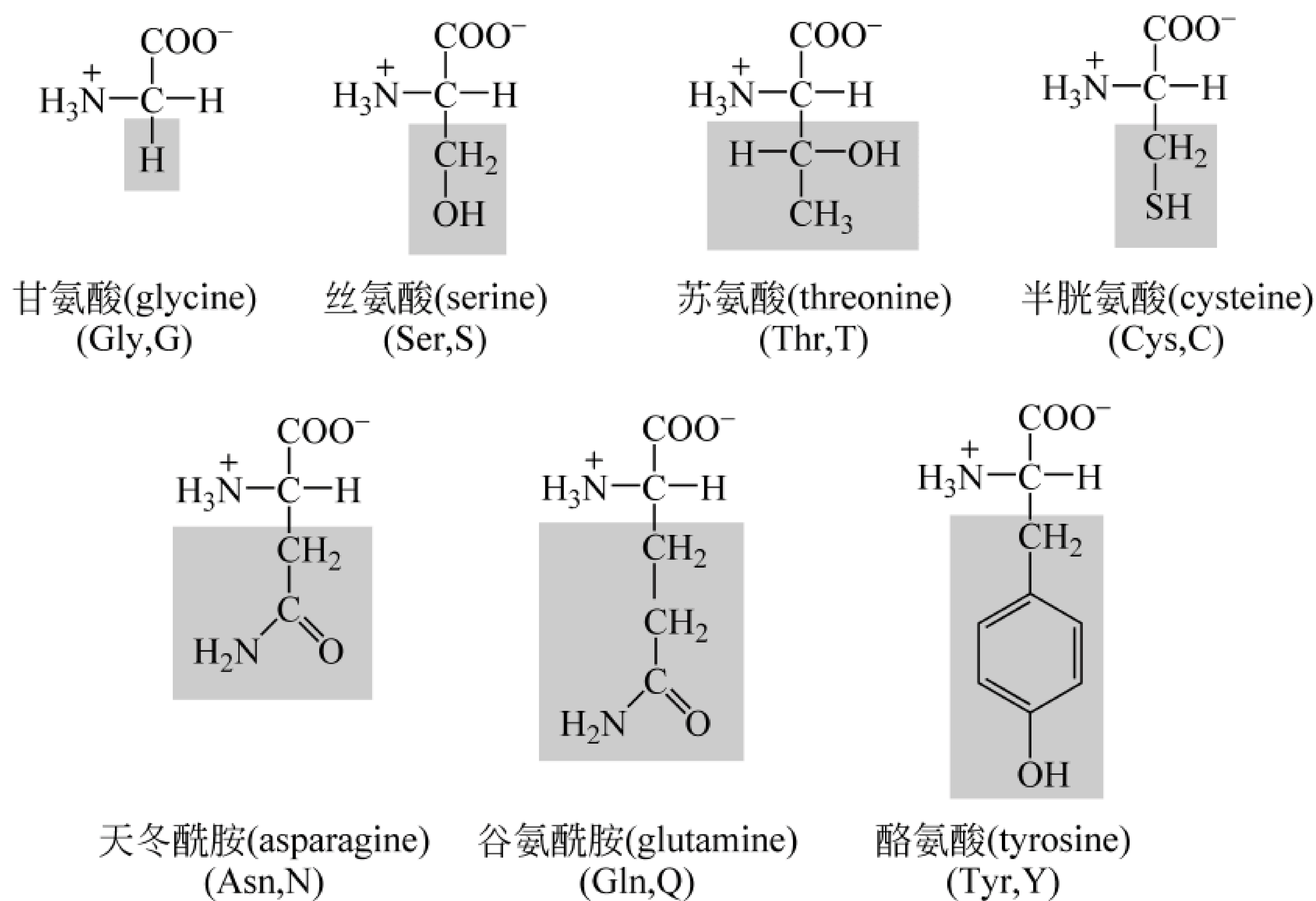


图 2.4 极性不带电荷氨基酸

括号中分别为氨基酸英文名称，以及 3 字母和单字母缩写

丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的羟基，半胱氨酸的巯基及天冬酰胺和谷氨酰胺中的酰胺基都是有利于形成氢键的成分。就是说除了甘氨酸之外，其他 6 种都含有能够与水形成氢键的侧链(R)，所以极性不带电荷氨基酸要比非极性氨基酸更易溶于水。甘氨酸是个最简单的氨基酸，其 R 只是一个氢，而且这个氢很难用于形成氢键。甘氨酸的溶解特性主要受极性氨基和羧基影响，所以将它归类于极性，不带电荷氨基酸。

另外，半胱氨酸是 20 种氨基酸中惟一一个带有巯基的氨基酸，当巯基氧化形成二硫键

时,两个半胱氨酸形成二硫化物胱氨酸(cystine)(图2.5)。

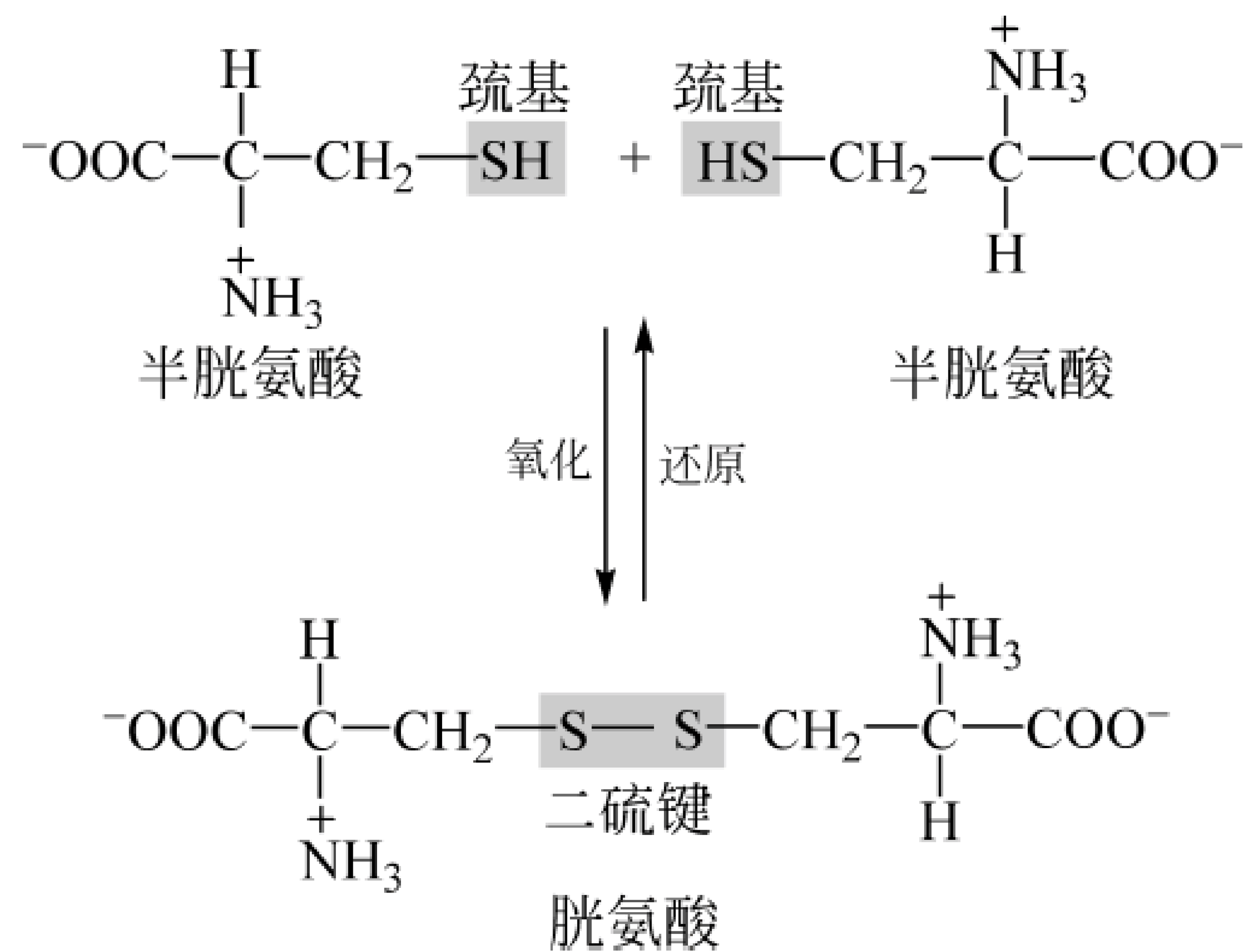


图2.5　胱氨酸的形成

巯基经氧化形成二硫键,两个半胱氨酸形成胱氨酸

3. 酸性氨基酸(2种)

酸性氨基酸包括天冬氨酸(α-氨基丁二酸)和谷氨酸(α-氨基戊二酸)(图2.6)。两种氨基酸都是二羧基氨基酸,分子中除了都含有α-羧基外,天冬氨酸还含有β-羧基,谷氨酸还含有γ-羧基,在pH7.0时带净负电荷,所以两个氨基酸又称为酸性氨基酸。

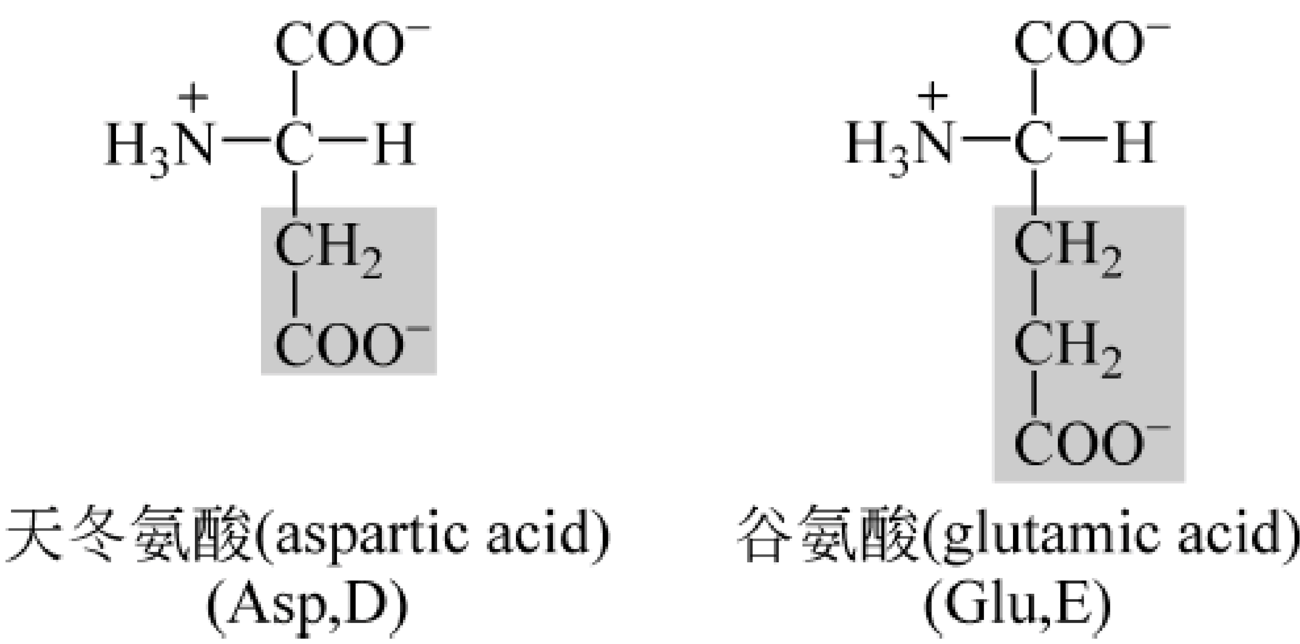


图2.6　酸性氨基酸

4. 碱性氨基酸(3种)

碱性氨基酸包括组氨酸(α-氨基-β-咪唑基丙酸)、赖氨酸(α,ε-二氨基己酸)和精氨酸(α-氨基-δ-胍基戊酸)(图2.7)。这是一组在pH7.0时带净正电荷,侧链都带有含氮碱基基团的氨基酸,所以称为碱性氨基酸。

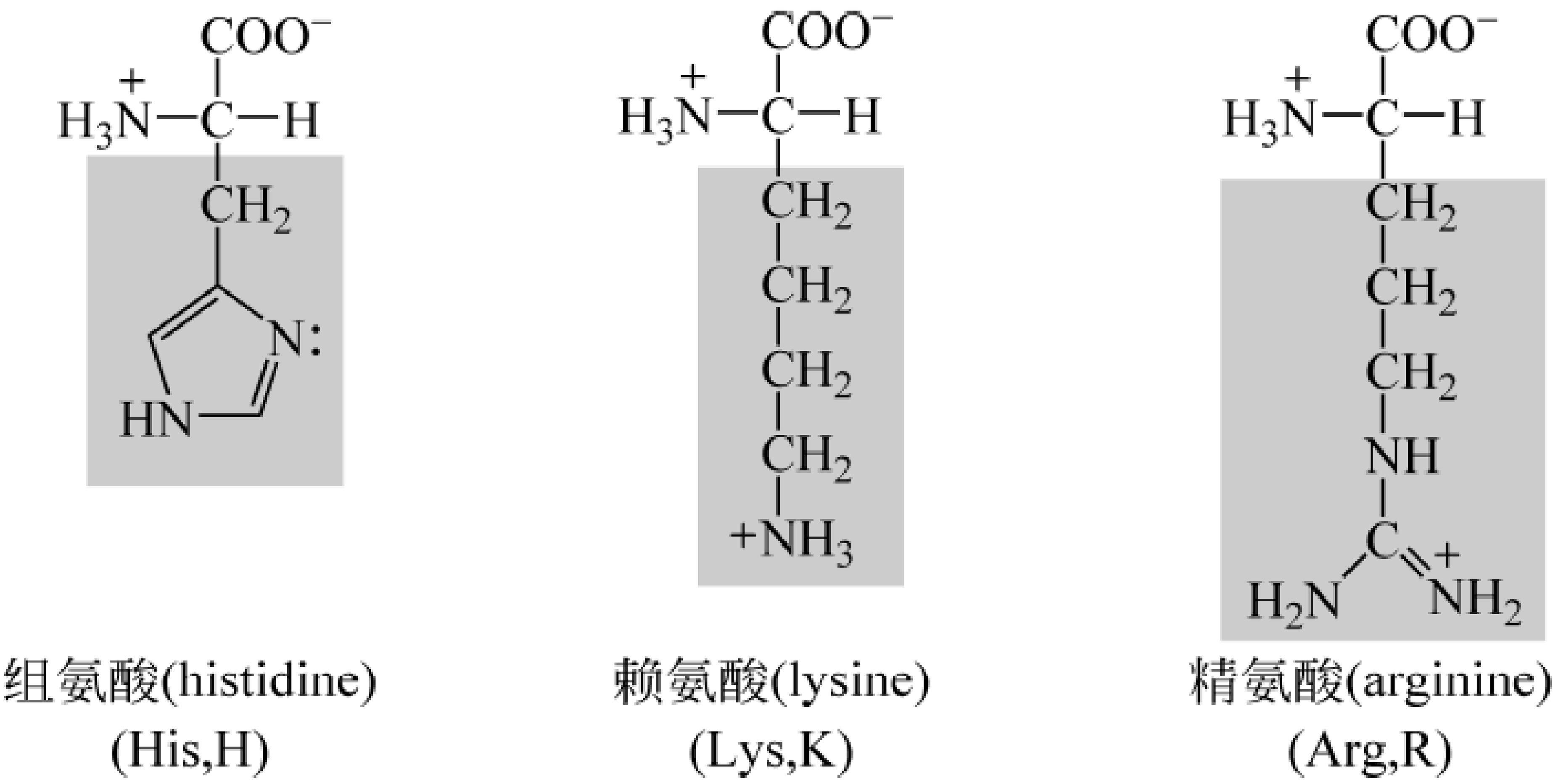


图2.7　碱性氨基酸

20种氨基酸中除了甘氨酸(R为H)外,其余19种氨基酸的α-碳都连接了4个不同基团,表明它们都存在不对称碳原子。其中异亮氨酸和苏氨酸中的α碳和β碳都为不对称碳,分别存在4种立体异构体,但出现在蛋白质中的只是*L*-异亮氨酸和*L*-苏氨酸。

另外,20种标准氨基酸在可见光区没有光吸收,在红外区和远紫外区(λ<200nm)都有光吸收。而在200～400nm的近紫外区只有芳香族氨基酸具有光吸收,在pH6.0,色氨酸和酪氨酸的最大光吸收约在280nm,而苯丙氨酸的最大光吸收约在260nm。

由于大多数蛋白质中都含有芳香族氨基酸,测量蛋白质溶液280nm吸收值后可以根据如下的Lambert-Beer公式测定蛋白质的含量:

$$A = \varepsilon c l$$

其中:A为吸光度(absorbance),也称为光密度(optical density, OD);ε为摩尔吸光系数,以前称为摩尔消光系数;c为浓度(mol/L);l为比色杯的内径或光程距离(cm)。

此外,芳香族氨基酸还具有较弱的荧光,而色氨酸还显现出一种寿命相对较长的磷光,人们也利用这些特性研究蛋白质结构。

2.2 氨基酸的酸碱性质

由于氨基酸含有酸性的α-羧基和碱性的α-氨基,有些侧链还含有可解离基团,所以当氨基酸溶解于水时,是以两性离子(兼性离子)存在于溶液中。兼性离子既可作为酸提供质子,也可作为碱接收质子,这种兼有酸碱性质的物质称为两性电解质。

一个单氨基、单羧基的氨基酸(例如丙氨酸)全质子化(如处于1mol /L HCl条件下)时,可看作是个二元弱酸,因为它含有可释放质子的—COOH和NH_3^+两个基团(图2.8)。

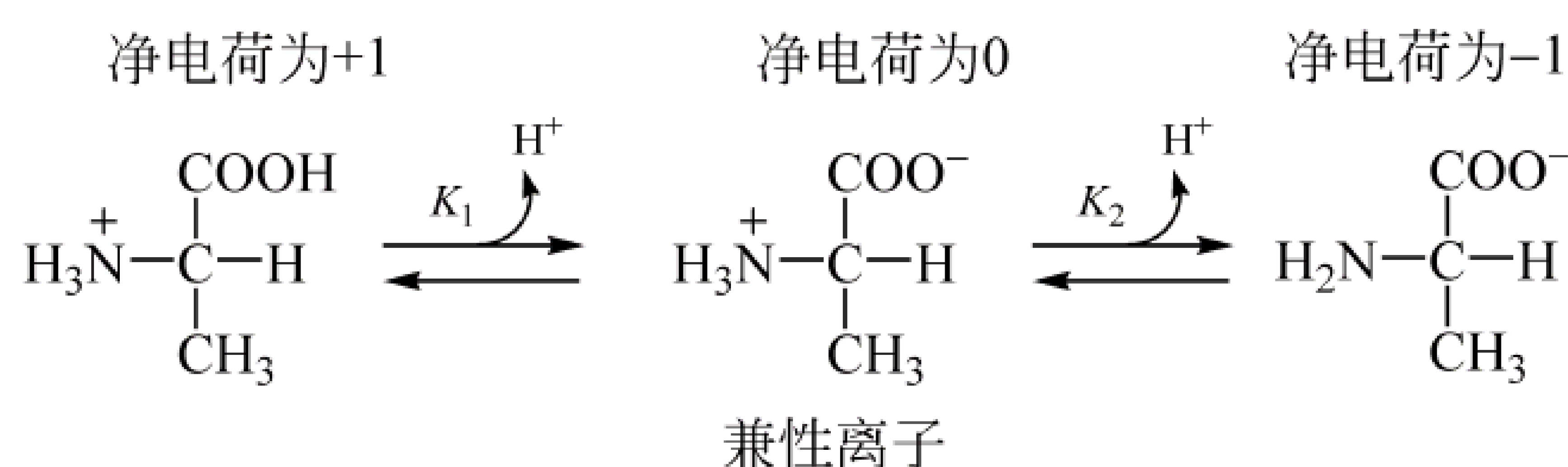


图2.8 丙氨酸的解离

图2.8中K_1和K_2表示解离常数,也称为平衡常数。用Ala^+、$Ala^\pm$和Ala^-分别表示Ala静电荷为+1、0和-1的离子形式。解离常数K_1可表示为:

$$K_1 = [Ala^\pm][H^+]/[Ala^+]$$

使用上述方程式计算相应的弱酸的解离常数K(有时也写作K_a),所得数值很小。如果像氢离子浓度那样用负对数表示这种弱酸的解离常数更方便,pK值越低酸性越强。

$$pK = \lg(1/K) = -\lg K$$

将上述两式变换一下:

$$1/[H^+] = 1/K_1 \cdot [Ala^\pm]/[Ala^+]$$

取负对数,可得到pH与pK的关系式:

$$pH = pK_1 + \lg [Ala^\pm]/[Ala^+]$$

若$[Ala^+]=[Ala^\pm]$,即有50%的Ala^+解离为$Ala^\pm$时,pH=pK_1,即这时的pH相当于Ala解离的第一个解离常数的负对数。

同样可得到解离常数K_2的表示式:

$$pH = pK_2 + \lg [Ala^-]/[Ala^\pm]$$

如果按照 Bronsted-Lowry 的酸碱学说,将给出质子的称为质子供体(共轭酸),而将接收质子的称为质子受体(共轭碱),pH 与 pK_a(解离常数常用 pK_a表示)之间的关系式可用 Henderson-Hasselbalch 等式表示,通过该方程可计算任何 pH 下离子化基团的比例([共轭碱]/[共轭酸]):

$$pH = pK_a + \lg([\text{共轭碱}]/[\text{共轭酸}])$$

pK_a可以通过测定滴定曲线的方法求得,假设滴定从全质子化的氨基酸开始,以加入的 NaOH 浓度对 pH 作图,可以得到相应的氨基酸的滴定曲线图。图 2.9 给出了全质子化丙氨酸的滴定曲线。

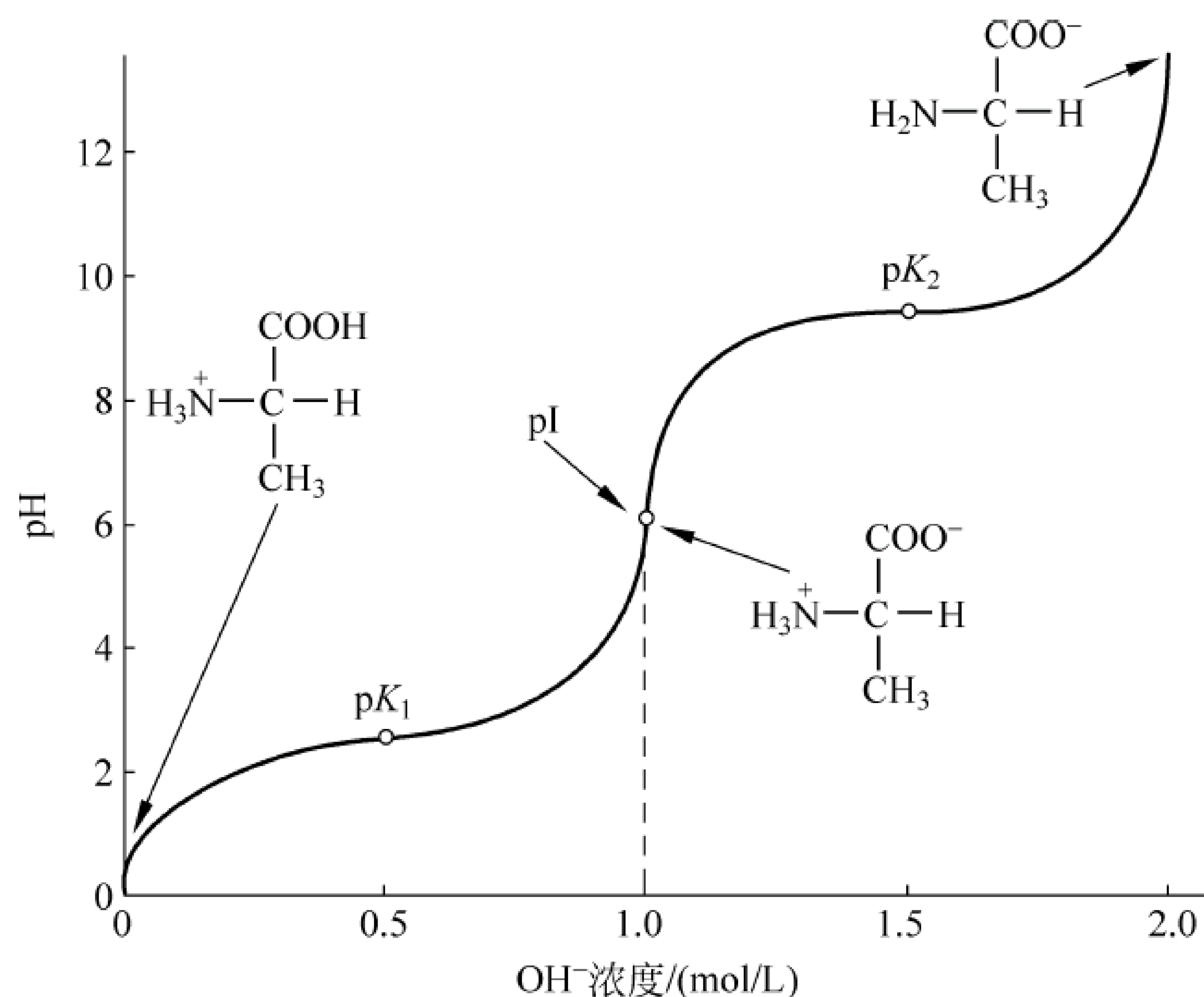


图 2.9 丙氨酸的滴定曲线

$pK_1=2.34$;$pK_2=9.96$;$pI=6.02$

从丙氨酸滴定曲线可看到两个解离常数附近是个平台,即此时加碱或加酸,其 pH 变化不大,所以这两个区域称为缓冲区。缓冲区范围为 $pK\pm1$,第一个缓冲区范围为 $pK_1\pm1$,即 pH1.34～3.34;第二个缓冲区范围为 $pK_2\pm1$,即 pH8.69～10.69。

组氨酸含有一个可解离的侧链,因此,它的滴定曲线多出了一个反映侧链的 pK_R(图 2.10)。

表 2.1 给出了 25℃下游离的 20 种标准氨基酸的 pK 值和氨基酸的等电点(pI)。

从 2.1 表中可以看出,只有组氨酸的侧链基团咪唑基的 pK_R值是 6.0,所以组氨酸是惟一的一个在生理条件下(pH7.0 左右)具有缓冲作用的氨基酸。表中虽然给出了酪氨酸和半胱氨酸的 pK_R,但酪氨酸的酚羟基和半胱氨酸的巯基解离很弱。

氨基酸等电点的计算很简单,pI 值就是处于净电荷为零(兼性离子)形式的两侧 pK 的算术平均值。丙氨酸的 pI 值就是它的两个 pK 值的算术平均值$(2.34+9.69)/2\approx6.01$。而组氨酸的 pI 值就是处于 His^0 形式的两侧 pK 的算术平均值,即$(9.17+6.0)/2=7.59$。

根据上述氨基酸滴定曲线分析和等电点计算,可以看到当氨基酸处于它的 pI 以上的 pH 时,带净负电荷,当处于它的 pI 以下的 pH 时,带净正电荷。氨基酸所处 pH 离 pI 越远,氨基酸携带的净电荷越多。

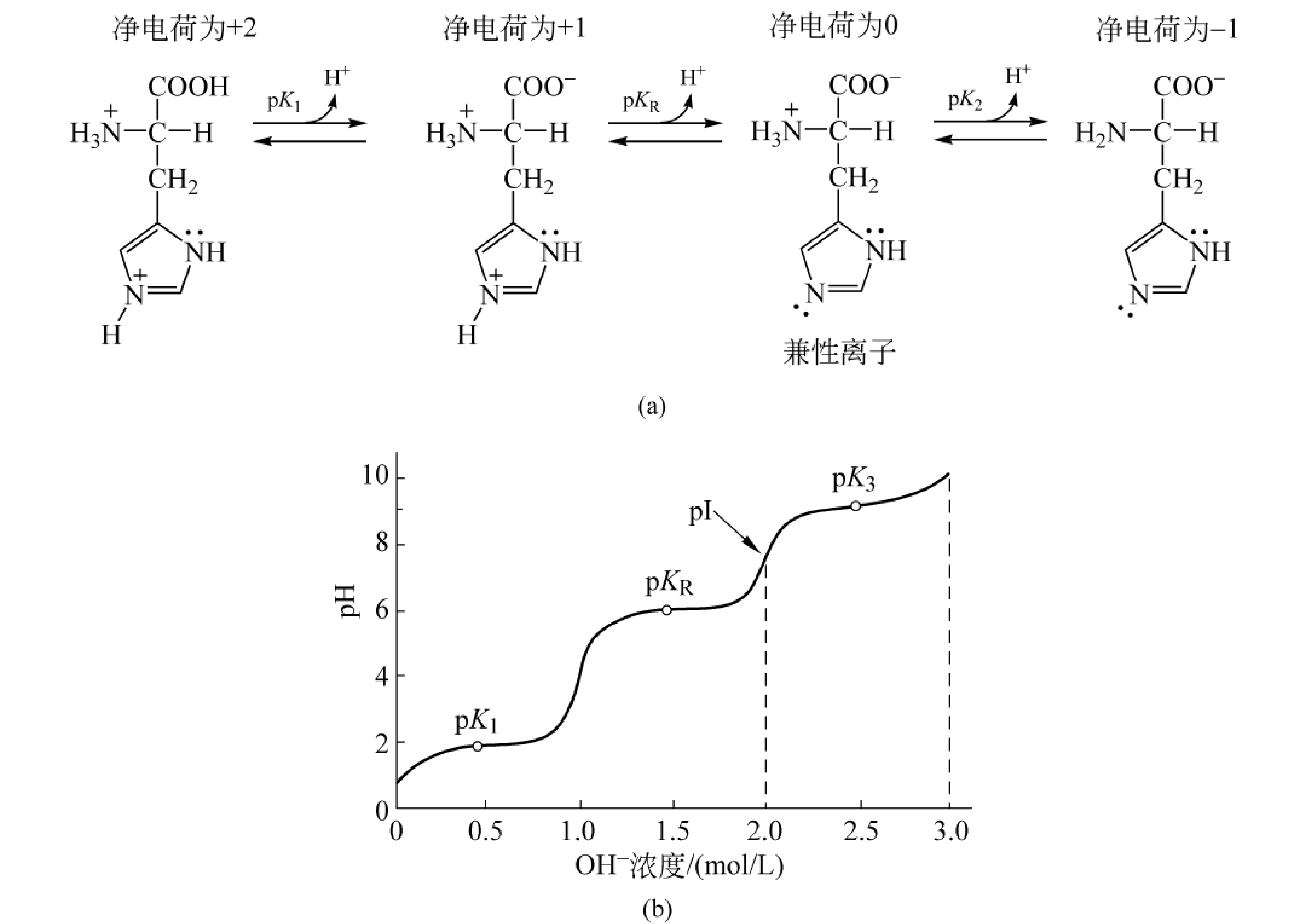


图 2.10 组氨酸的离子化

(a) 组氨酸的去质子化；(b) 组氨酸的滴定曲线，$pK_1=1.82$，$pK_R=6.0$，$pK_2=9.2$，$pI=7.59$

表 2.1 氨基酸的 pK 和 pI 值

氨基酸	相对分子质量	pK_1	pK_2	pK_R	pI	蛋白质中出现的几率*
		α-COOH	α-NH_3^+	R 基团		
甘氨酸	75	2.34	9.60		5.97	7.5%
丙氨酸	89	2.34	9.69		6.01	9.0%
缬氨酸	117	2.32	9.62		5.97	6.9%
亮氨酸	131	2.36	9.60		5.98	7.5%
异亮氨酸	131	2.36	9.68		6.02	4.6%
脯氨酸	115	1.99	10.96		6.48	4.6%
苯丙氨酸	165	1.83	9.13		5.48	3.5%
酪氨酸	181	2.20	9.11	10.07	5.66	3.5%
色氨酸	204	2.38	9.39		5.89	1.1%
丝氨酸	105	2.21	9.15		5.68	7.1%
苏氨酸	119	2.11	9.62		5.87	6.0%
半胱氨酸	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.8%
蛋氨酸	149	2.28	9.21		5.74	1.7%
天冬酰胺	132	2.02	8.80		5.41	4.4%

续表

氨基酸	相对分子质量	pK_1	pK_2	pK_R	pI	蛋白质中出现的几率*
		α-COOH	α-NH_3^+	R 基团		
谷氨酰胺	146	2.17	9.13		5.65	3.9%
天冬氨酸	133	1.88	9.60	3.65	2.77	5.5%
谷氨酸	147	2.19	9.67	4.25	3.22	6.2%
赖氨酸	146	2.18	8.95	10.53	9.74	7.0%
精氨酸	174	2.17	9.04	12.48	10.76	4.7%
组氨酸	155	1.82	9.17	6.00	7.59	2.1%

* 在 200 多种蛋白质中出现的平均几率

2.3 氨基酸的化学反应

氨基酸的 α-氨基、α-羧基以及可反应侧链基团能进行多种化学反应,这里着重描述一些生物化学中常利用的 α-氨基反应和侧链反应。

1. α-氨基反应

图 2.11 给出了几种常利用的 α-氨基反应,这几个反应常用于鉴定蛋白质或多肽的 N-端氨基酸残基和蛋白质氨基酸序列测定。由于 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene,

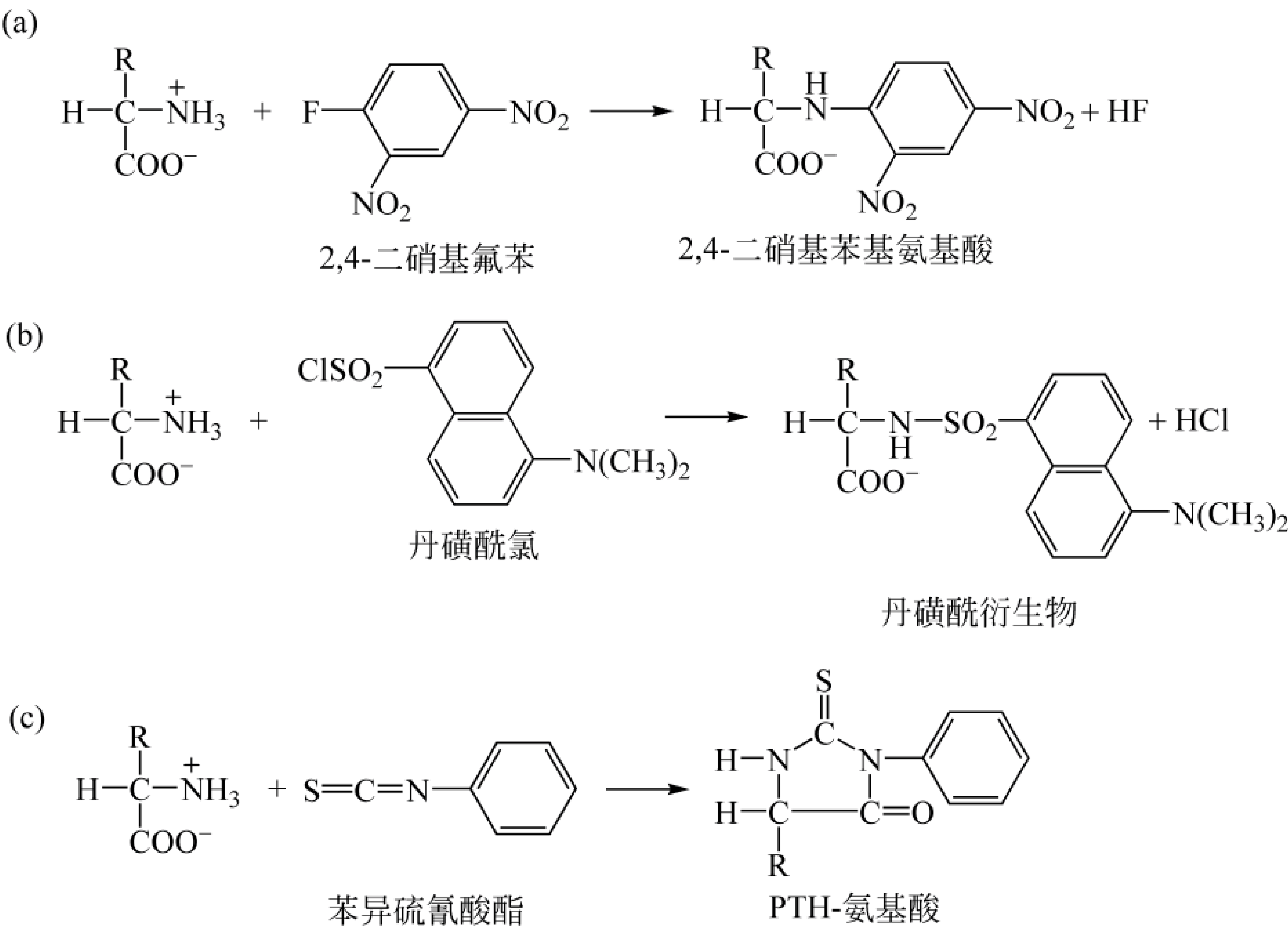


图 2.11 氨基酸 α-氨基反应

(a) α-氨基与 2,4-二硝基氟苯反应;(b) α-氨基与丹磺酰氯反应;(c) α-氨基与苯异硫氰酸酯反应,PTH (phenylthiohydantoin):苯乙内酰硫脲

DNFB)曾被 Sanger 用于测定氨基酸序列,所以也称为 Sanger 试剂。

2. 氨基酸与茚三酮反应

氨基酸与茚三酮(ninhydrin)的反应是检测和定量氨基酸、蛋白质的重要反应,氨基酸的 α-氨基和 α-羧基都参与了反应。茚三酮在弱酸性溶液中与氨基酸共热,具有游离氨基的氨基酸都生成紫色化合物(λ_{max}为 570nm)(图 2.12)。脯氨酸是一个亚氨基酸,与茚三酮反应生成的是黄色化合物(λ_{max}为 440nm)。

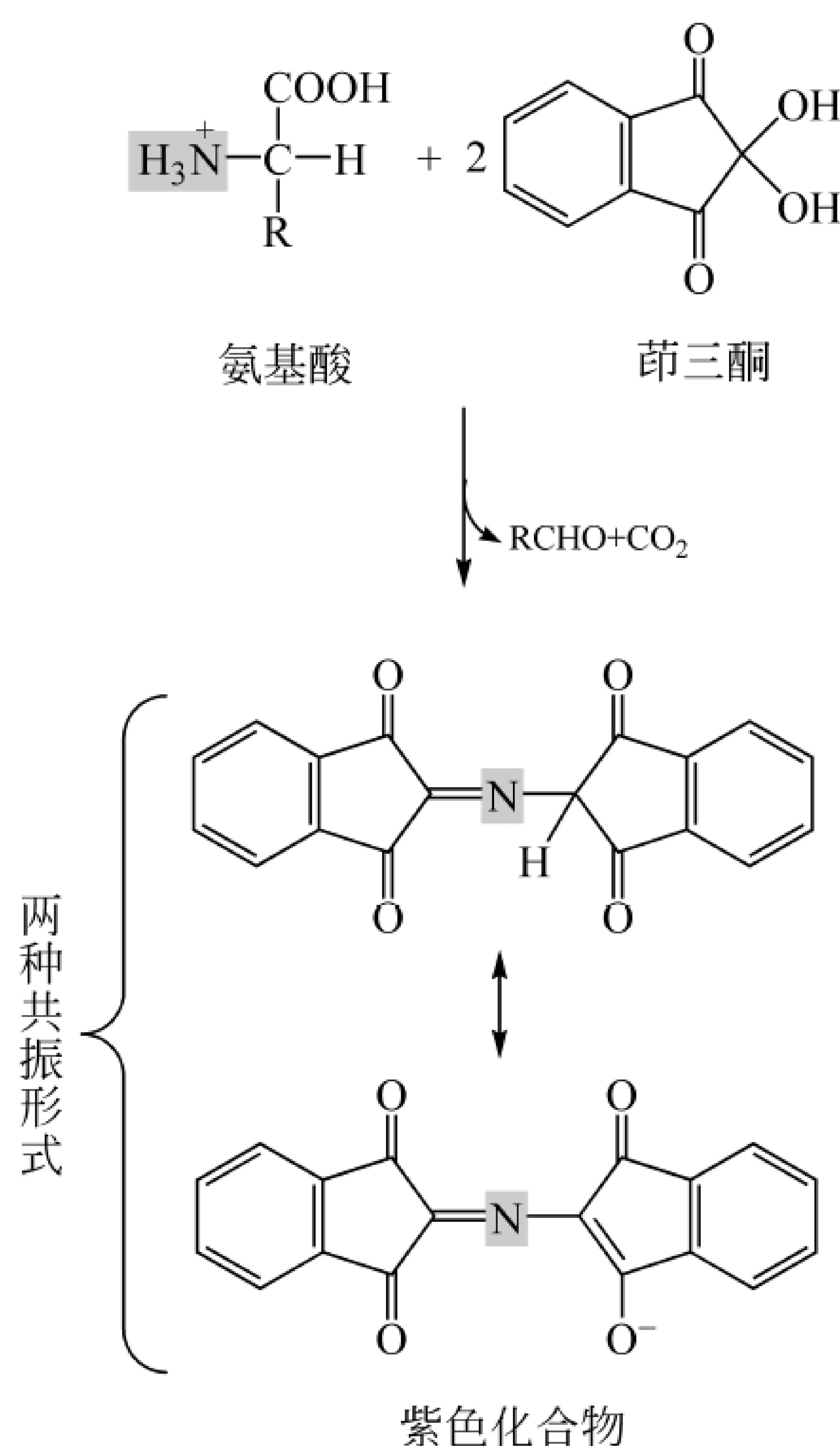


图 2.12　氨基酸与茚三酮的反应

一分子氨基酸与两分子茚三酮反应生成具有两种共振形式的紫色化合物

在一定反应条件下,产生的颜色强度(溶液中的光吸收)与氨基酸浓度成比例,根据测得的溶液的吸光度,可以算出相应的氨基酸和蛋白质的浓度。

3. 侧链基团的特异反应

很多氨基酸侧链都带有功能基团,例如 Cys 的巯基、赖氨酸的 ε-氨基、Arg 的胍基、组氨酸的咪唑基等,这些功能基团与一些特异试剂可进行特异反应,这些反应常用于酶活性反应中心的必需氨基酸残基的鉴定以及蛋白质标记。图 2.13 给出了常用的 Cys 巯基的几个特异反应和 Lys 的 ε-氨基的一个特异反应。

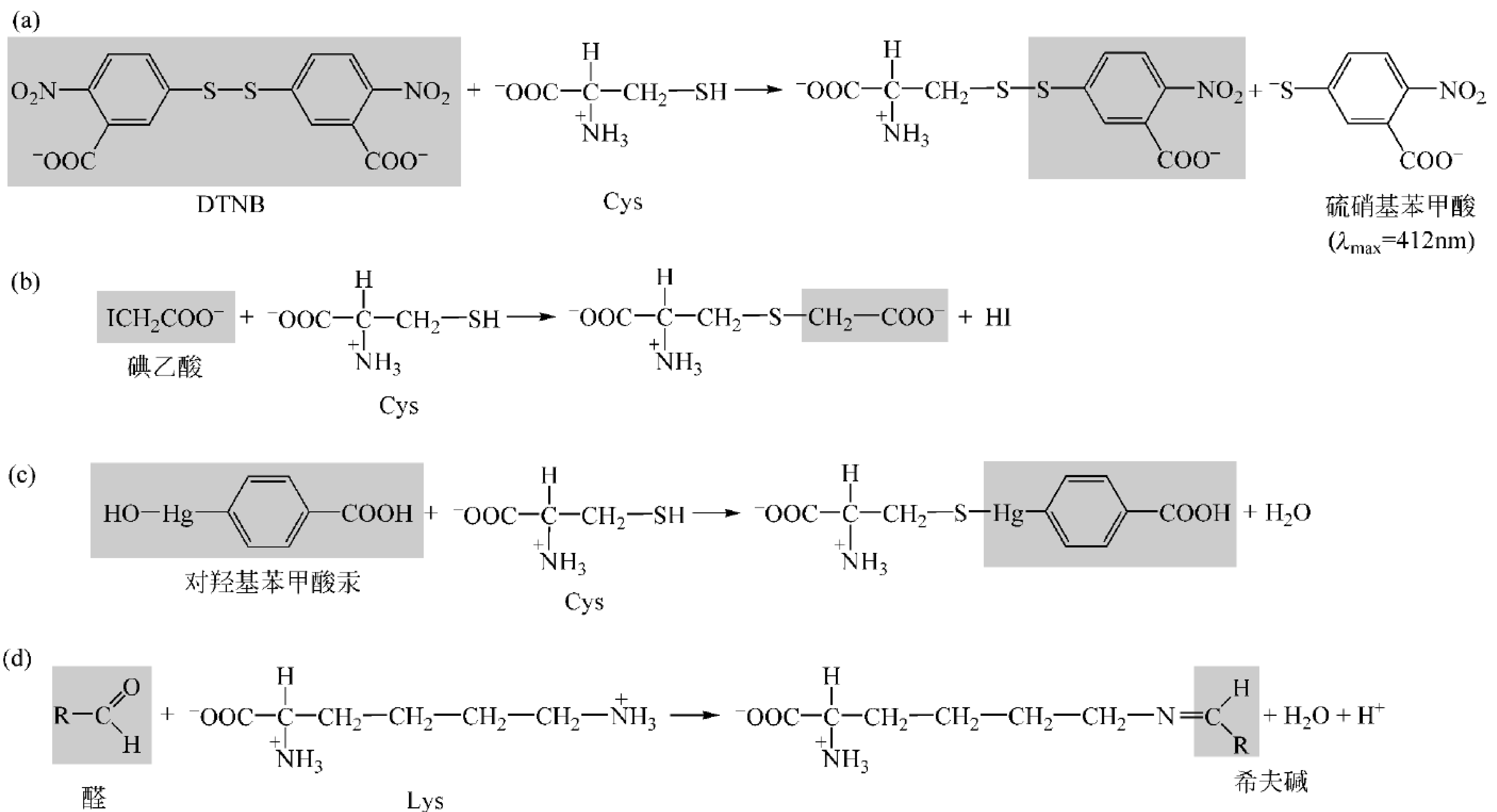


图 2.13 氨基酸侧链基团的反应

(a)~(c) 分别为 DTNB、碘乙酸和对羟基苯甲酸汞与 Cys 侧链—SH 的特征反应,DTNB(5,5′-二硫-双-(2-硝基苯甲酸)),也称为 Ellman 试剂;(d) Lys 侧链氨基与醛生成希夫碱的反应

2.4　肽

一个氨基酸的α-羧基与另一个氨基酸的α-氨基脱去一分子水就形成了二肽，将两个氨基酸连接在一起的共价键称为酰胺键[肽键(peptide bond)](图2.14)。氨基酸聚合的产物称为肽(peptide)，构成肽的各个氨基酸成分被称为氨基酸残基。根据聚合形成肽的氨基酸数目的多少，又习惯称为二肽、三肽、寡肽和多肽，也常称为肽链或多肽链。

除了末端被共价修饰和成环的肽链之外，每一个肽链末端都有一个游离的α-氨基和一个游离的α-羧基，分别称为氨基端(N端)、羧基端(C端)。肽链中氨基酸残基都是从N端至C端编号的，每个残基可用3字母或单字母缩写形式表示。例如，图2.14中的二肽就可以写成Ala-Ser，相应的单字母表示：A-S，或直接写成AS。

多肽的酸碱性质是由α-氨基和α-羧基以及可解离的R基团决定的，因此像氨基酸一样，多肽和蛋白质也有特征的滴定曲线和等电点(pI)，这些性质在多肽和蛋白质的分离技术中被广泛运用。下面简单介绍几种具有生理活性的小肽、胰岛素和人工合成的甜味剂阿斯巴甜。

1. 肌肽(carnosine)

肌肽是个出现在肌肉组织中的二肽—β-丙氨酰组氨酸，N端为氨基连接在β-碳的β-丙氨酸(图2.15)，其生理功能可能是参与肌肉收缩。

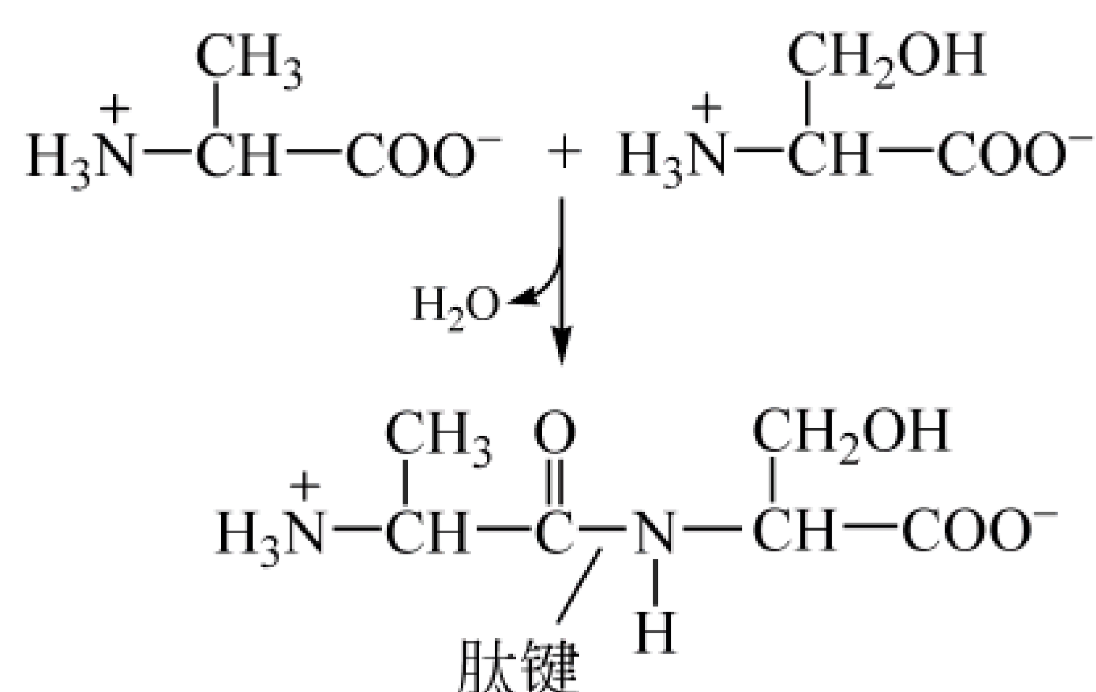


图2.14　两个氨基酸之间形成肽键

丙氨酸与丝氨酸形成二肽，命名为丙氨酰丝氨酸

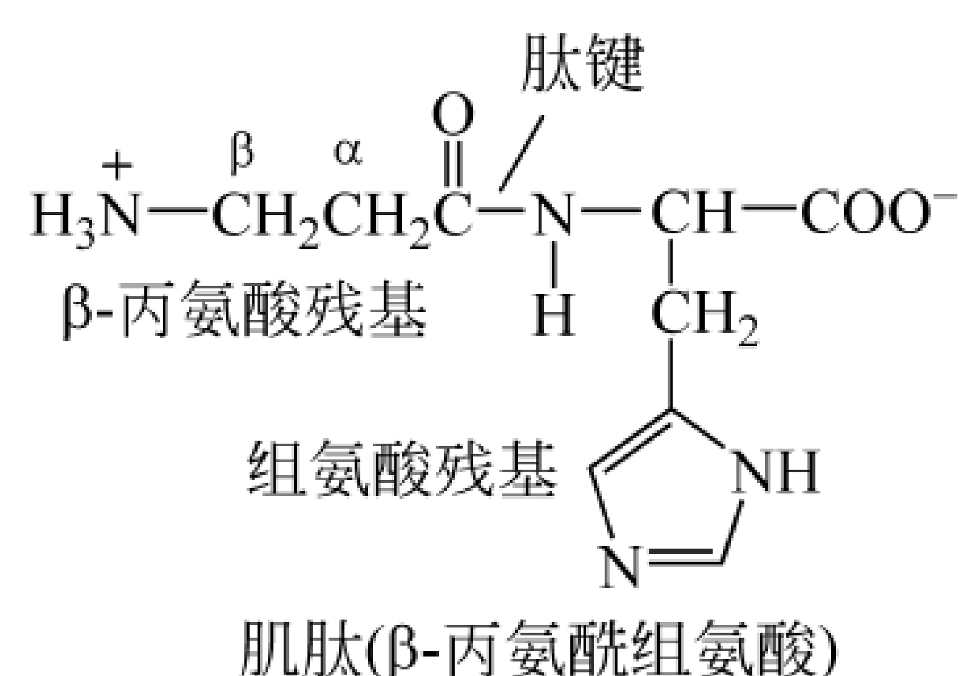


图2.15　肌肽结构

N端为β-丙氨酸残基

2. 谷胱甘肽(glutathione)

谷胱甘肽是个三肽，其组成为γ-谷氨酰半胱氨酰甘氨酸(图2.16)。要注意的是，谷氨酸与下一个半胱氨酸形成肽键时不是α-羧基，而是γ-羧基，所以缩写可表示为γGlu-Cys-Gly。两分子还原型谷胱甘肽(reduced glutathione，GSH)经氧化生成氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione，GSSG)。

还原型谷胱甘肽在体内的主要作用是保护含有巯基的蛋白质，使其保持生理活性。例如还原型谷胱甘肽转换为氧化型谷胱甘肽可以维持红细胞中血红蛋白以及其他蛋白质中的活性半胱氨酸残基处于还原状态(游离巯基)，避免被其他氧化剂氧化。

3. 催产素(oxytocin)和血管加压素(vasopressin)

催产素和血管加压素都是下丘脑分泌的激素，被储存在垂体后叶。催产素与血管加压素都是九肽(由于两个半胱氨酸形成一个胱氨酸，所以也称为八肽)，结构也很相似，分子中

的两个半胱氨酸残基都形成一个二硫键,但催产素 3 位为异亮氨酸,血管加压素 3 位为苯丙氨酸,催产素 8 位为亮氨酸,而血管加压素 8 位为精氨酸(图 2.17)。

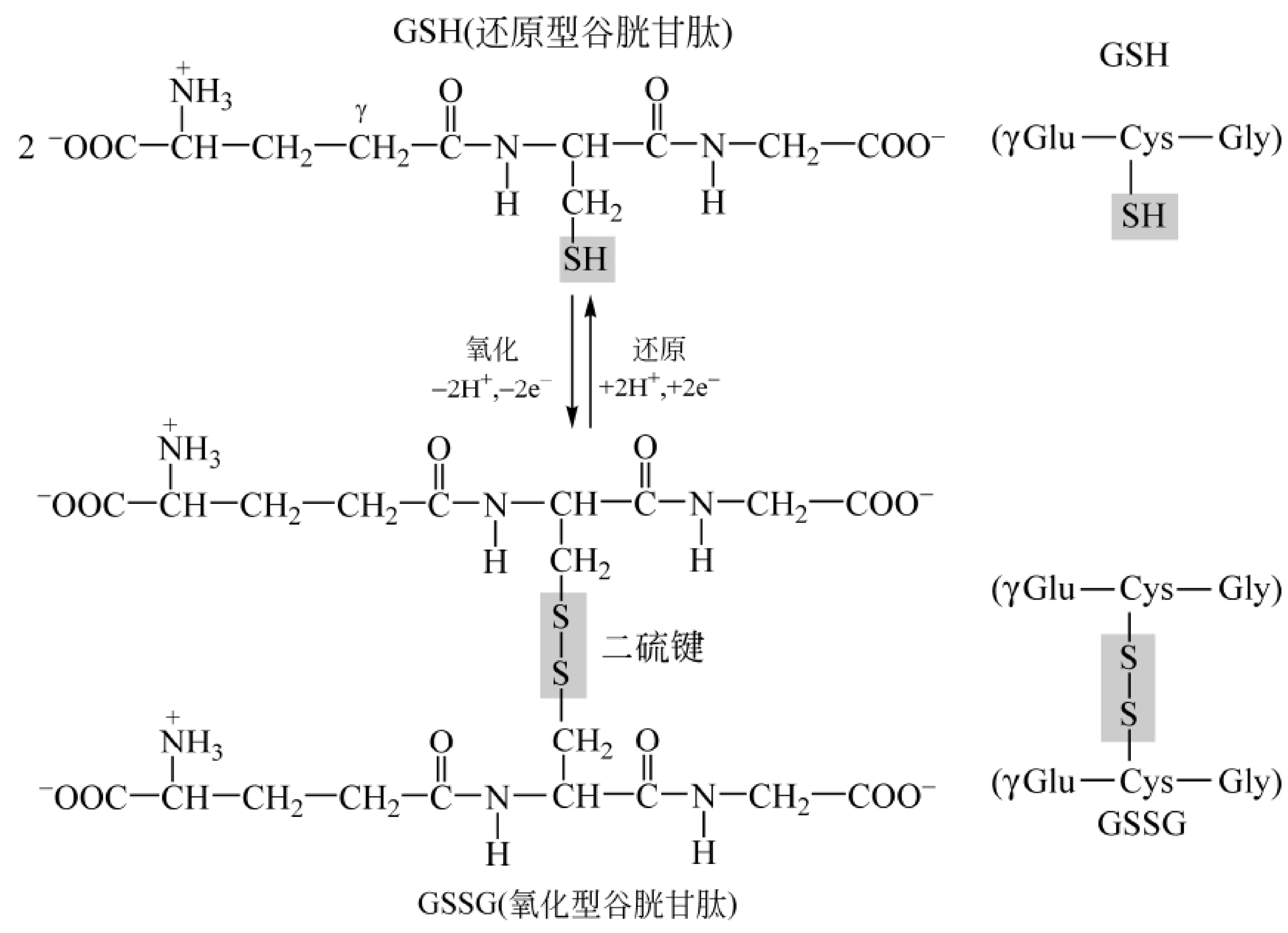


图 2.16 谷胱甘肽

图左侧为结构式表示的 GSH 和 GSSG,右侧为缩写表示

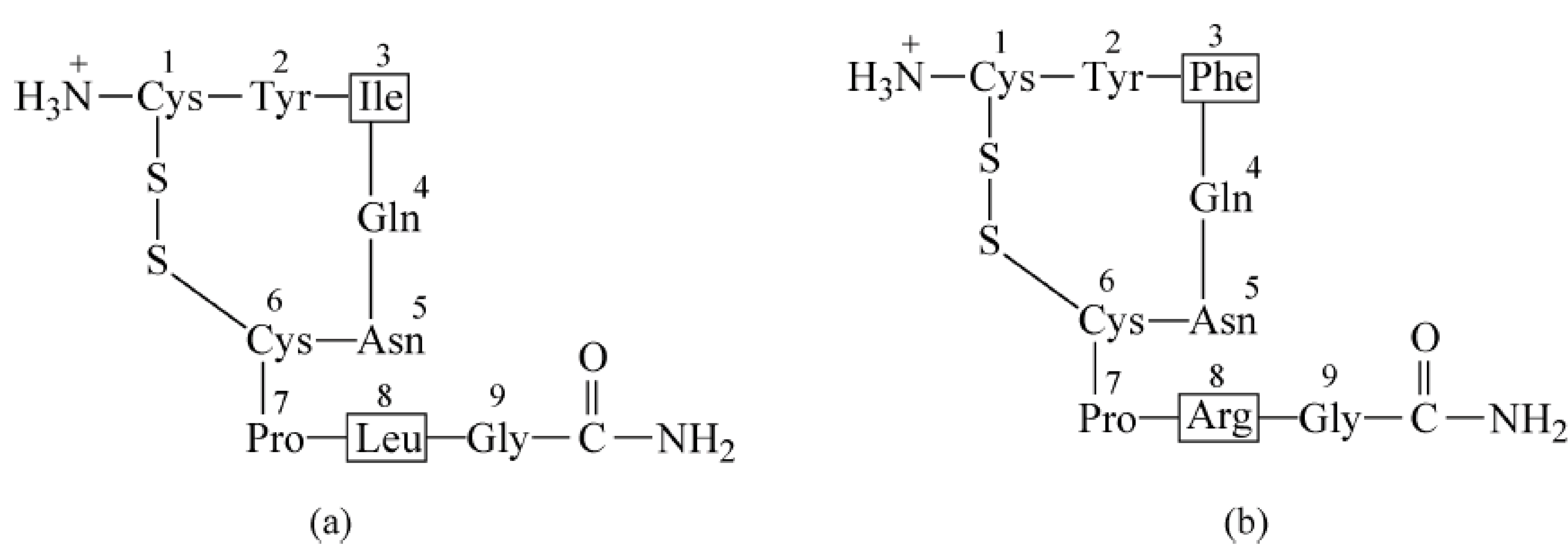


图 2.17 两个下丘脑激素

(a) 催产素;(b) 血管加压素

催产素也称缩宫素,主要生理作用是使平滑肌收缩,特别是子宫肌肉,具有催产以及促使乳腺泌乳的作用。血管加压素也称为抗利尿激素(antidiuretic hormone,ADH),是调解水代谢的重要激素。血管加压素能使小动脉收缩,增高血压,促进水分的重吸收,减少排尿。

4. 胰岛素

胰岛素由胰腺中胰岛的 β 细胞制造,是一个由 A 链和 B 链构成的含有 51 个氨基酸残基的多肽,A 链含有 21 个氨基酸残基,B 链含有 30 个氨基酸残基,两条链通过二硫键连接,另外在 A 链中还存在一个链内二硫键(图 2.18)。中国科学家于 1965 年首次人工合成了牛胰岛素。

胰岛素的主要生理功能是促进组织吸收葡萄糖,促进肝糖原、肌糖原以及脂肪合成,并

抑制肝糖原和脂肪降解。

5. 阿斯巴甜(aspartame)

阿斯巴甜不是天然存在的活性肽,它是一个人工合成的二肽-天冬氨酰苯丙氨酸甲酯(图 2.19),常用作食物和饮料的甜味剂,其甜度是蔗糖的 200 倍。在购物时如果留意的话,会看到有的饮料的标签中注明使用的甜味剂是阿斯巴甜。

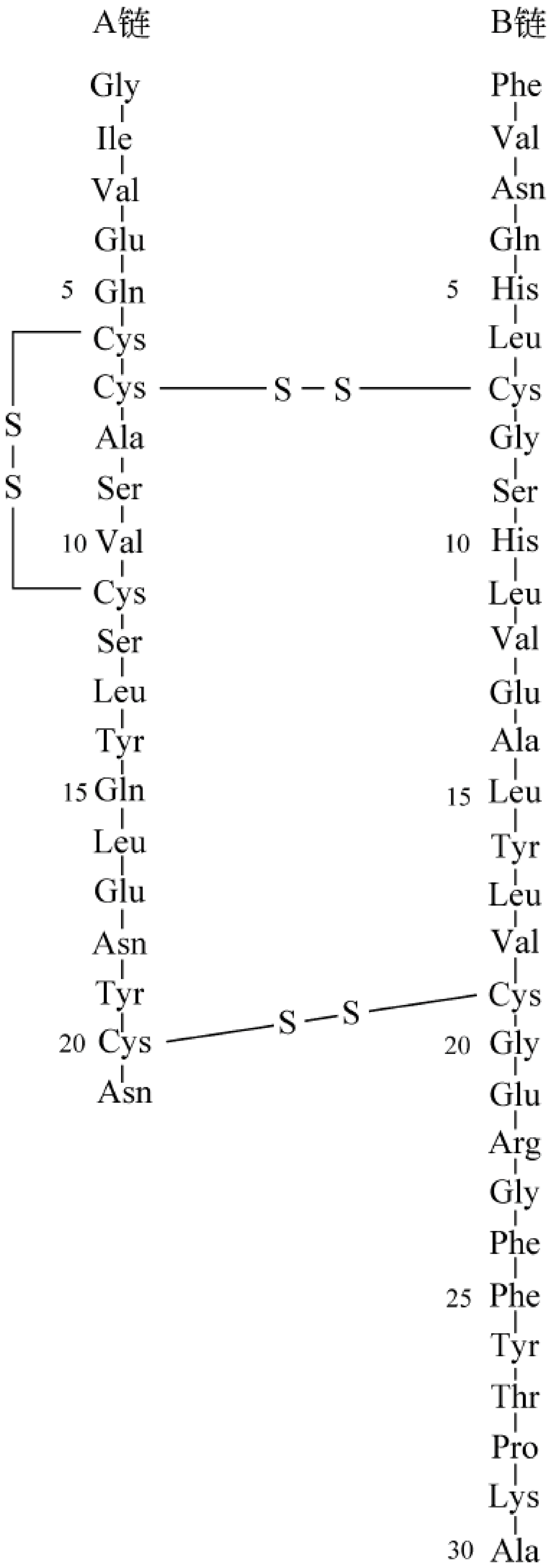


图 2.18 牛胰岛素结构

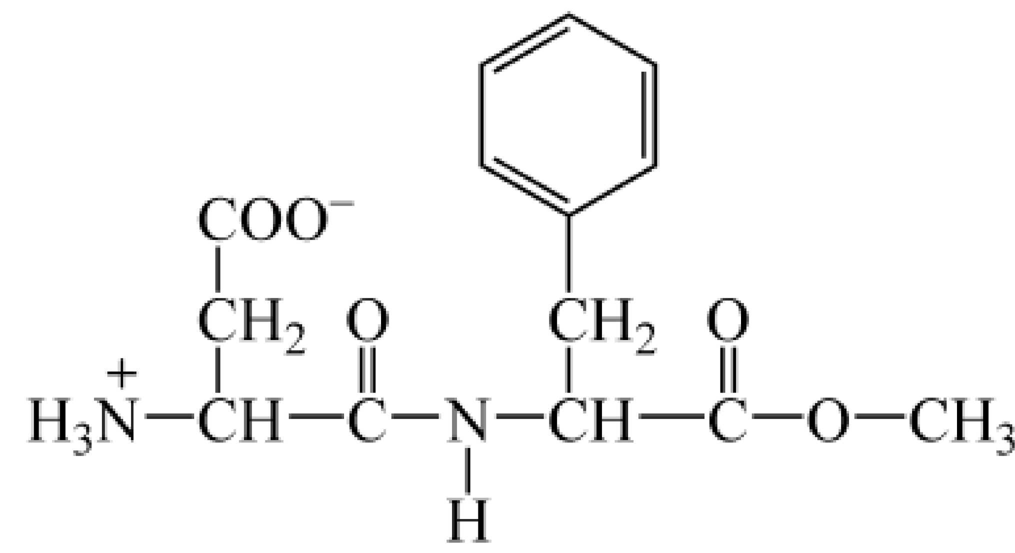


图 2.19 Aspartame 结构

2.5 蛋白质一级结构

蛋白质是氨基酸的聚合物,一些蛋白质由一条多肽链组成,而有些蛋白质含有两条以上的多肽链,多肽链之间以非共价键结合。多肽链可能相同,也可能不同,这样的蛋白质称为

多亚基蛋白质。由相同亚基组成的蛋白质称为寡聚蛋白质。有些蛋白质除了氨基酸成分外，还含有其他成分(称为辅基)，这样的蛋白质称为结合蛋白质。例如，含脂基的称为脂蛋白，含糖基的称为糖蛋白，含金属的称为金属蛋白。

蛋白质结构按照一级结构、二级结构、三级结构和四级结构等4个结构层次来解析和描述。蛋白质一级结构就是它的线性氨基酸序列，每一种蛋白质都具有惟一的氨基酸序列。实际上，蛋白质的氨基酸序列都是由相应的DNA决定的。

解析一个蛋白质的结构和功能通常都需要了解或测定它的氨基酸序列，它是阐明蛋白质生物活性的分子基础。研究表明蛋白质的一级结构决定它的空间结构，为了推测多肽链折叠成高度专一的具有生物活性的三维结构，也需要知道蛋白质的氨基酸序列。

对人类遗传病的跟踪研究报道表明，很多遗传病大多都是蛋白质的氨基酸序列中的一个残基改变引起的，例如致命的镰状细胞贫血就是由于血红蛋白中一个氨基酸的突变导致的。就是说蛋白质的一级结构改变了，蛋白质的功能也可能发生变化。

另外，通过蛋白质一级结构的比较可以揭示进化关系。一组进化上相关的同源蛋白质在不同物种中行使着相同的功能，这些来自不同物种的同源蛋白质的氨基酸序列都很相似。例如细胞色素 c，它是一个含铁的由104～111个氨基酸残基组成的线粒体蛋白质，在真核细胞的生物氧化中传递电子。由于细胞色素 c 几乎存在于所有的需氧生物中，所以通过在分子水平上比较来自不同种属的细胞色素 c，可以看出它们之间的进化关系(图2.20)。

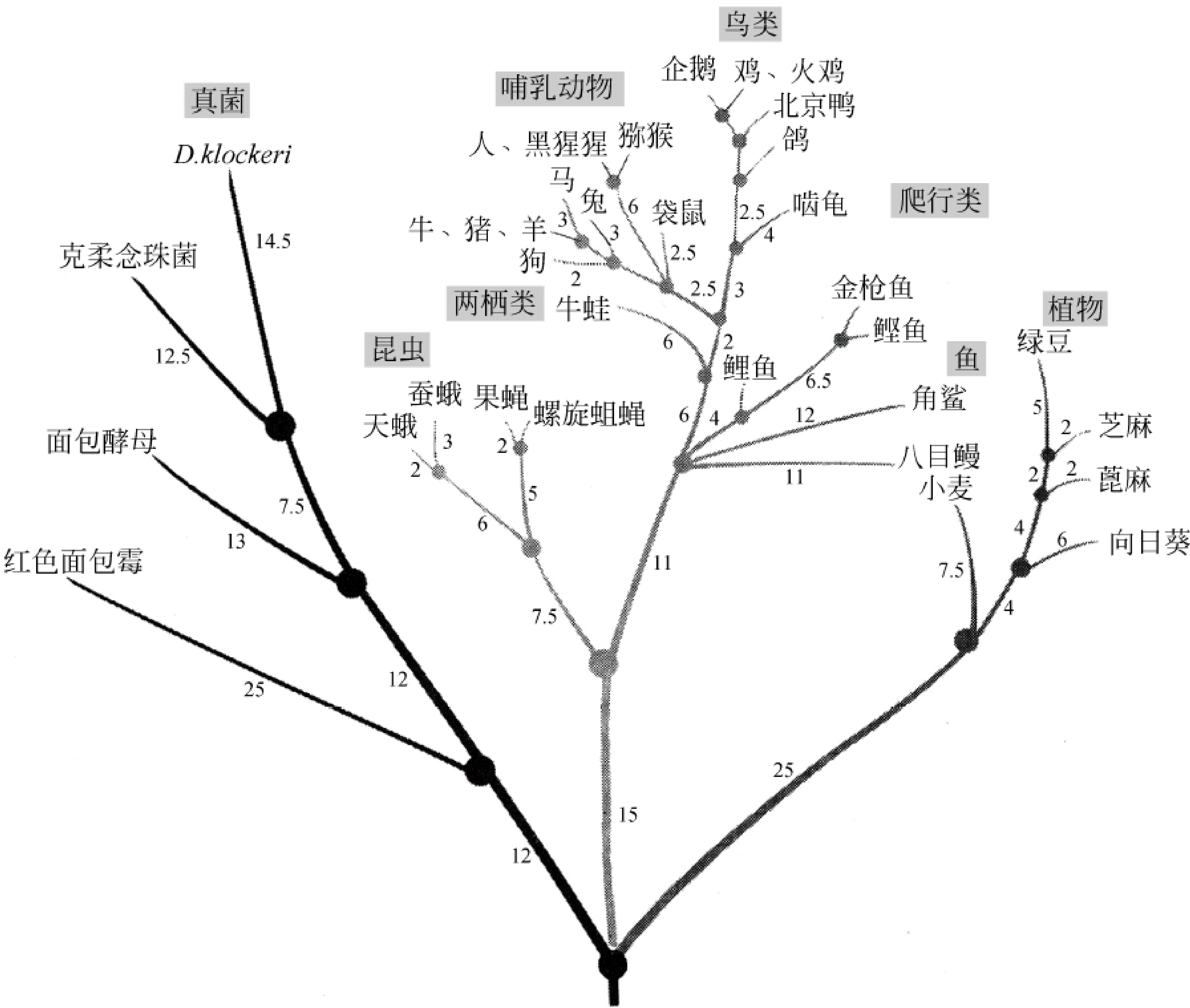


图2.20 细胞色素 c 的系统进化树

每个枝节点都是由该节点向上延伸的物种的原始祖先，枝条旁边的数字表示两个相邻枝节点或物种的细胞色素 c 之间每100个残基的差异数

例如人与黑猩猩的细胞色素 *c* 的氨基酸序列完全一样，但与猴、狗、金枪鱼和酵母的细胞色素 *c* 相比，可变换的氨基酸残基数依次为 1、10、21 和 44。那些进化中不易改变的、保守的氨基酸残基是维持细胞色素 *c* 功能所必需的。

2.6　蛋白质纯化与分析

为了研究一个特定蛋白质，必须从各种蛋白质混合物中将其纯化出来。蛋白质的来源通常是组织或微生物细胞，经匀浆使细胞裂解将蛋白质释放到粗提液中。然后可利用不同蛋白质在不同盐浓度中溶解度不同，使杂蛋白从溶液中析出的盐析作用，有选择地将靶蛋白质沉淀。盐析中经常使用的盐是硫酸铵。

通过盐析制备的粗提液中盐的浓度都很高，不利于进一步使用其他方法进行纯化，所以都要通过透析将盐浓度降低。通常是将盐析制备的粗提液装在一个用半通透的赛璐玢膜制造的透析袋内，两端封好后悬浮在一个装有理想浓度的缓冲液的容器内进行透析，通过多次更换透析液，可将粗提液盐浓度降低到合适程度。经透析后的样品可进一步采用层析、电泳等各种方法进行分级分离。

2.6.1　柱层析

柱层析(column chromatography)是一类将不溶性基质作为固相填充到柱子中，使作为流动相的待分离溶液样品流过固相，样品中各个成分与固相进行不同程度的相互作用，使得各个成分在固相中的迁移率产生差别，从而达到分离靶蛋白的目的，所以柱层析常用于溶液中蛋白质混合物的分级分离(图 2.21)。

图 2.21　柱层析示意图

根据固相基质的不同，层析又分为离子交换层析(ion-exchange chromatography)、凝胶层析(gel chromatography)和亲和层析(affinity chromatography)等(图 2.22)。

1. 离子交换层析

离子交换层析是利用在一定 pH 下不同蛋白质带电种类和电荷量的差异进行分离的技术。柱基质是合成的结合了带电基团的聚合物，图 2.22(a)给出的是阴离子交换层析的示意图，阴离子交换树脂结合着阳离子基团，例如 $N^+(C_2H_5)$，所以结合带负电荷的分子，不结

合带正电荷的分子。同样道理,结合了阴离子基团(例如 SO_3^-)的称为阳离子交换树脂,将结合带正电荷的分子。

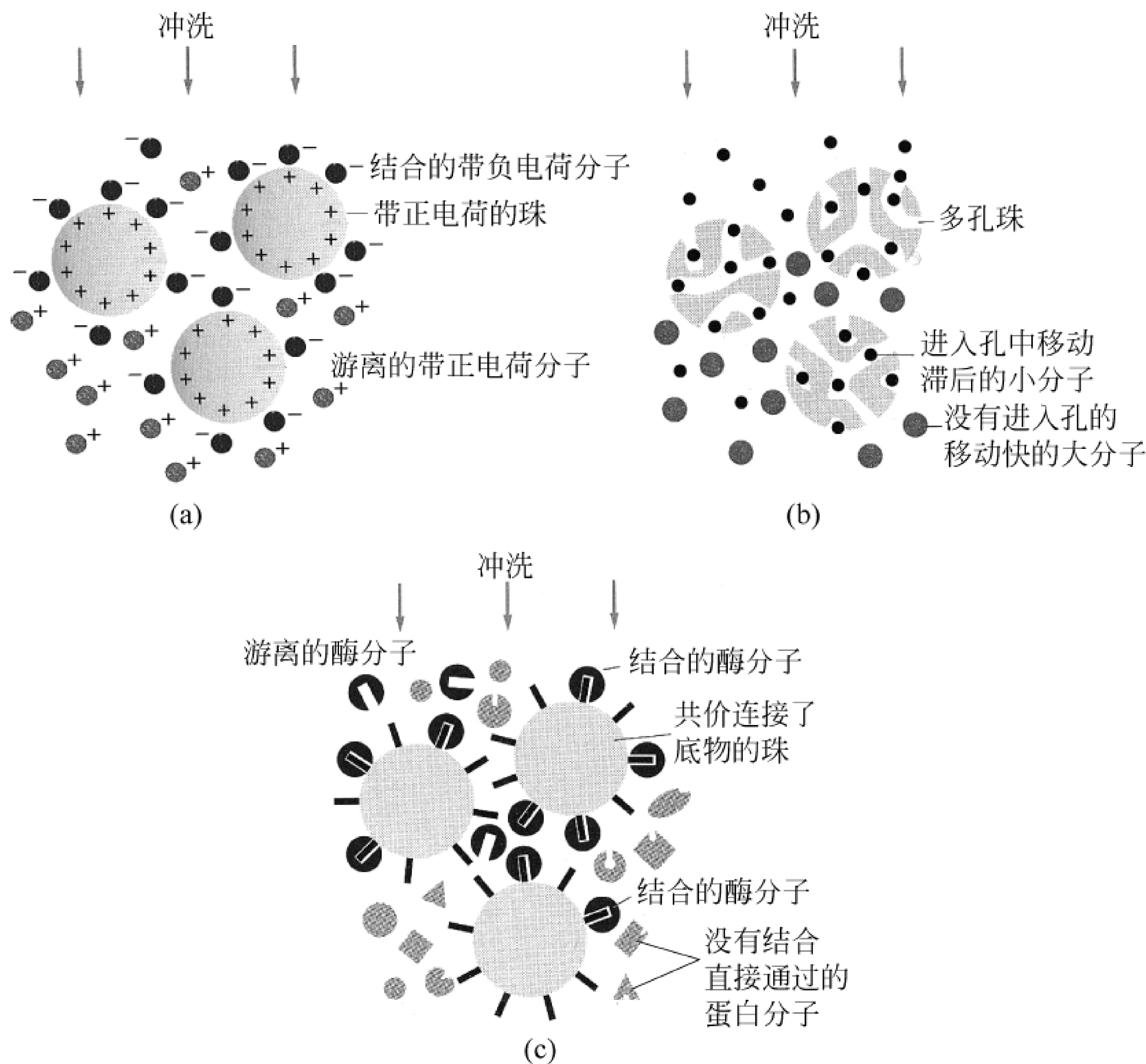


图 2.22　层析常用的3种固相基质

(a) 离子交换层析；(b) 凝胶层析；(c) 亲和层析

3个图表示的都是加样、冲洗后柱中固相基质与样品中靶蛋白和杂蛋白作用的情况

2. 凝胶层析

凝胶层析是按照天然蛋白质相对分子质量大小进行分离的技术,又称为凝胶过滤(gel-filtration chromatography)、分子筛层析或排阻层析。就像图2.22(b)显示的那样,单个凝胶珠本身是带有交联网状的珠,像个"筛子",不同类型凝胶的筛孔的大小不同。不同型号的凝胶都有一个分级分离范围,如Sephadex G-75的范围为3000～70 000,70 000称为该型号凝胶的排阻相对分子质量,即该型号凝胶不能分离70 000以上的分子。

当含有分子大小不同的蛋白质样品加到凝胶柱上后,比凝胶珠孔径大的蛋白质分子由于不能进入珠内移动得快,直接通过凝胶珠之间的缝隙首先被洗脱下来。而比凝胶珠孔径小的分子由于可进入凝胶珠的内部,走的路径长,移动较慢。因此通过凝胶层析就可以按照大分子先出来,小分子后出来的规律将不同大小的分子洗脱下来。

在一定条件下,被分离的蛋白质的相对分子质量的对数与其洗脱体积成比例,所以利用天然分子量已知的一组蛋白质做成一个标准曲线,然后利用同样的柱子进行未知蛋白质的层析,获得该蛋白质的洗脱体积,就可利用标准曲线求出未知蛋白质的天然相对分子质量。

3. 亲和层析

亲和层析是一种最有选择性的柱层析,是根据蛋白质和它的配体(ligand)之间的相互

作用来分离的。配体共价结合在柱基质上，配体可以是酶底物，或是抗体。图 2.22(c)是一种固相基质共价结合了底物的亲和层析示意图。只有与底物特异作用的酶才能结合在固相基质上，而不匹配的蛋白质直接被洗出，最后再用含游离底物的溶液将结合在柱基质上的酶洗脱下来。

2.6.2 电泳

电泳分离蛋白质是利用带电荷不同的蛋白质在电场中迁移率的差别达到分离目的的。蛋白质电泳通常是在聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel)中进行的。一般凝胶介质中的pH 维持在碱性区，目的是使大多数蛋白质都带有负电荷，这样它们可以向阳极迁移。蛋白质的迁移与蛋白质的质量和带电荷的多少有关。

1. SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

蛋白质样品未经变性直接在聚丙烯酰胺凝胶介质上进行的电泳称为聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE)，蛋白质的迁移率取决于蛋白质所带的净电荷、分子大小和形状，蛋白质基本上维持其天然状态。就是说如果蛋白质是由数个多肽链组成的，电泳后仍然维持原有状态。

在聚丙烯酰胺凝胶基础上发展了十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE)。使用含有去污剂 SDS 和还原剂(通常为巯基乙醇)的样品处理液对蛋白质样品进行处理(煮沸 3～5min)，通过加热和 SDS 使蛋白质变性，如果蛋白质有两个或多个多肽链，将解离为游离的多肽链。同时，还原剂可以切断蛋白质中二硫键。

由于 SDS 在电泳条件下是带有负电荷的分子，同时它有一个长的疏水尾巴(图 2.23)。SDS 通过疏水尾巴与肽链中氨基酸残基的疏水侧链结合，结合的比率约是一个蛋白质分子中每两个氨基酸残基结合一分子的 SDS。

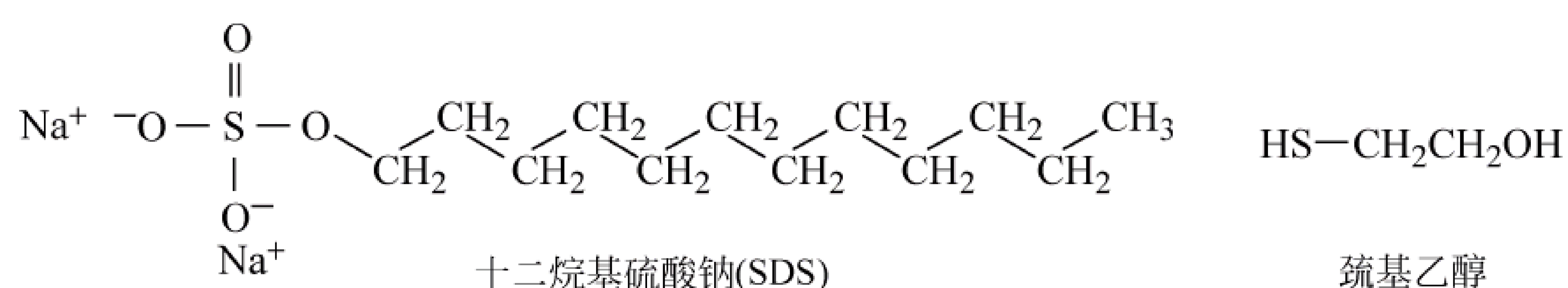


图 2.23 SDS 和巯基乙醇分子结构

多肽链结合大量 SDS 后，基本上使多肽链覆盖上了相同密度的负电荷。由于负电荷量很大，掩盖了不同蛋白质(多肽链)间原来所带电荷的差别，使得不同的 SDS-蛋白质复合物具有几乎相同的荷质比(电荷/多肽链质量)。而且结合 SDS 后蛋白质变性，大多都呈现相似的长椭圆棒形状。电泳时 SDS-蛋白质复合物在凝胶中的迁移率不再受蛋白质原有电荷和形状的影响，而主要取决于多肽链相对分子质量，所以，SDS-PAGE 常用来分析蛋白质的纯度和大致测定蛋白质的相对分子质量(图 2.24)。

在 SDS-PAGE 中，一定凝胶浓度下，蛋白质(实际上是多肽链)相对分子质量的对数与多肽链的迁移率呈线性关系，依据标准蛋白质相对分子质量对数与迁移率的标准曲线，由未知蛋白质迁移率就可求出未知蛋白质的相对分子质量(严格讲应是多肽链的相对分子质量)[图 2.24(c)]。

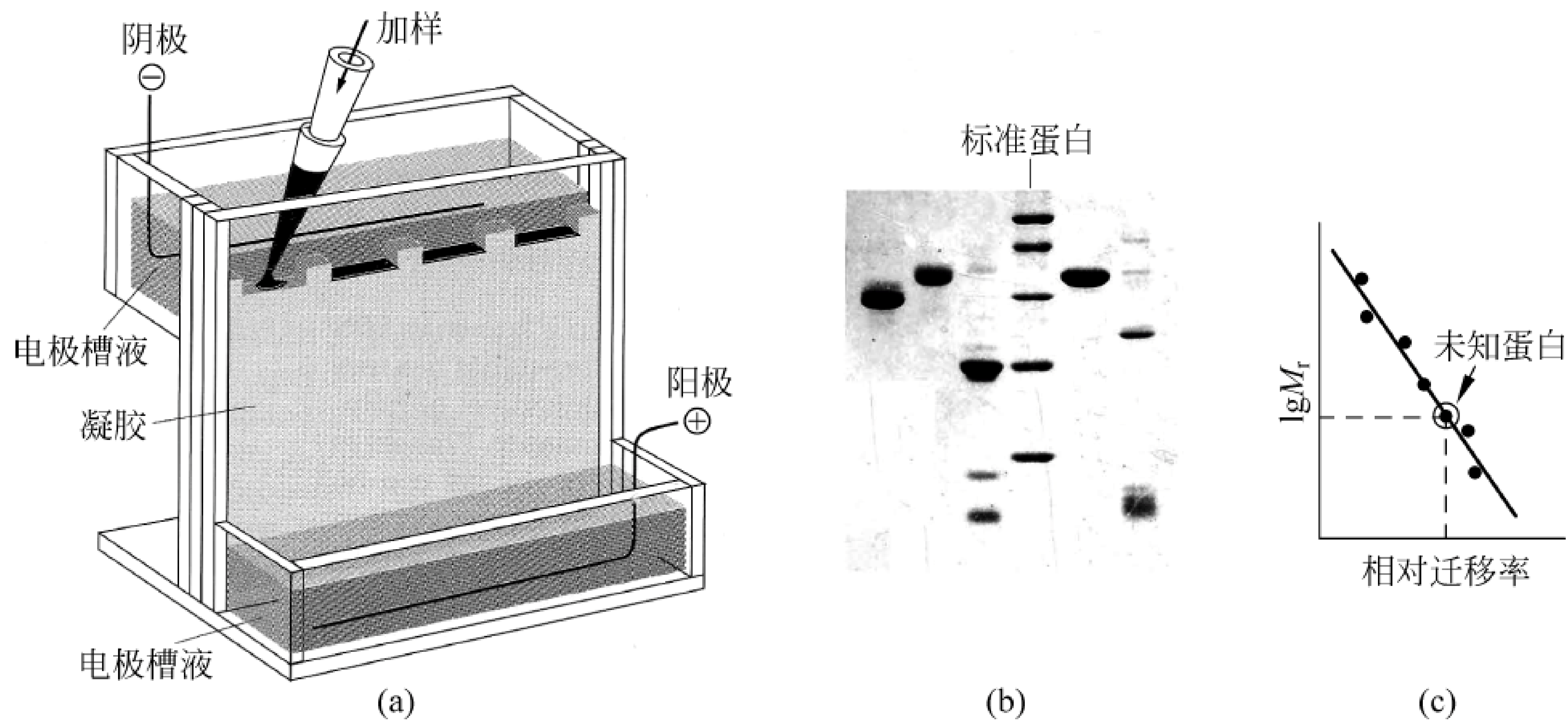
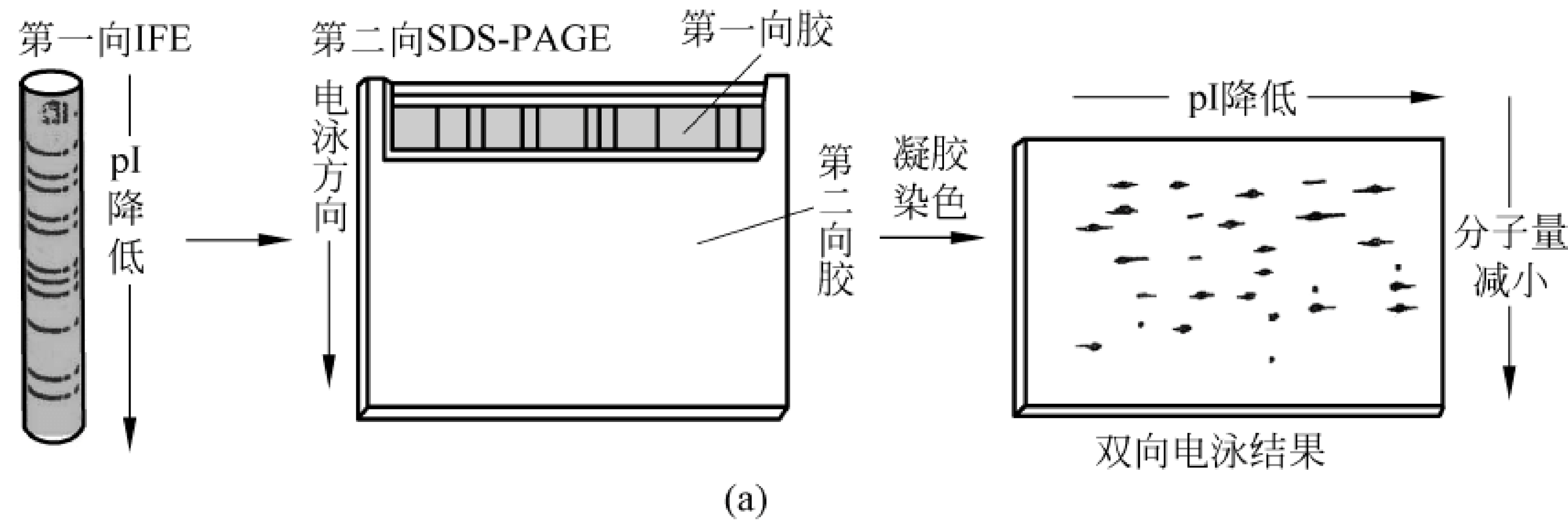


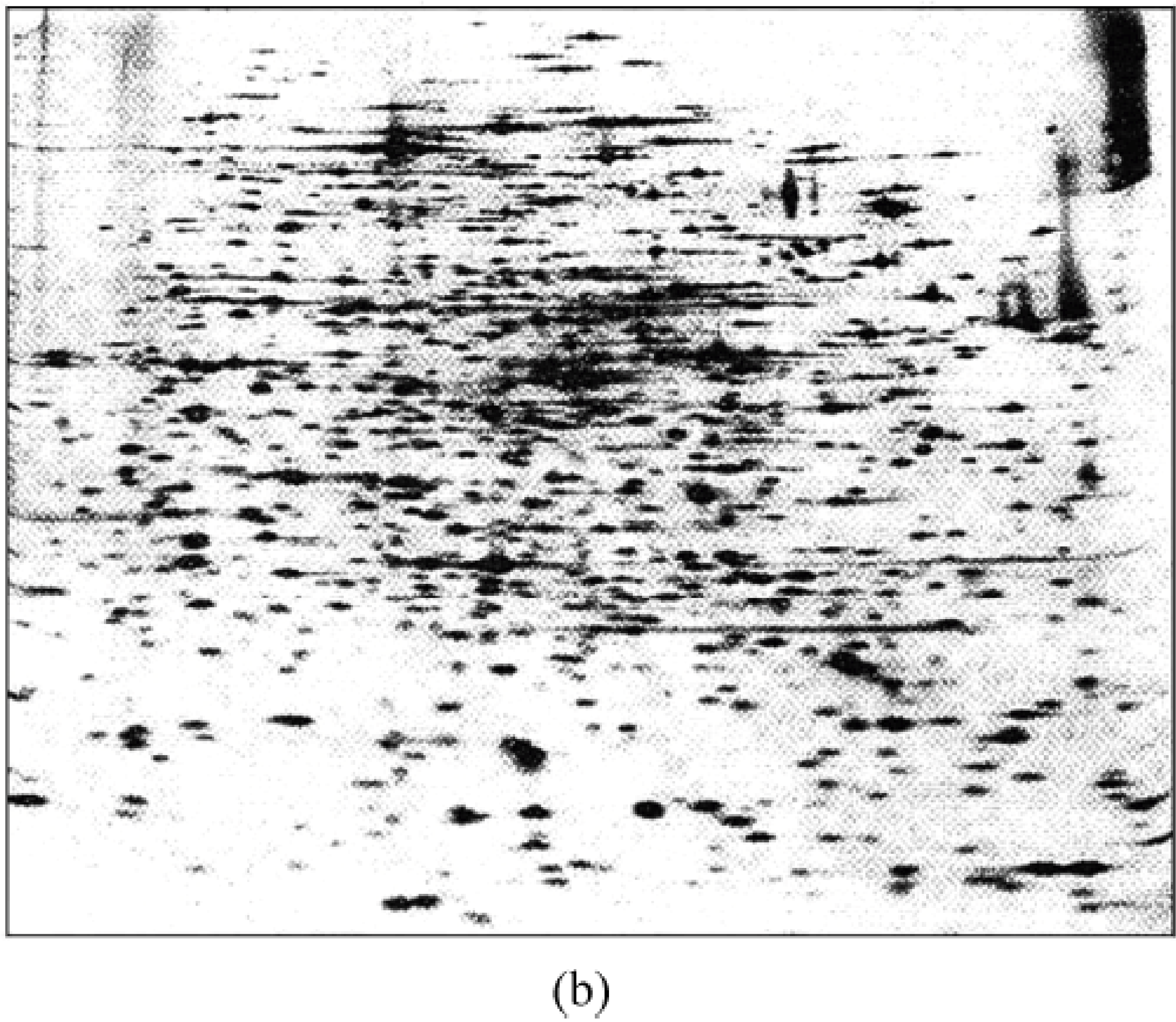
图 2.24 SDS-PAGE

(a) 电泳槽,包括夹在两块玻璃板之间的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,上电极槽液和下电极槽液,经 SDS 和巯基乙醇处理的蛋白质样品加到凝胶上部样品槽后,接通电源,所有 SDS-蛋白质复合物都向着阳极迁移;(b) 电泳后凝胶经染色显示出蛋白质的电泳图;(c)利用同一块胶上标准蛋白做标准曲线,求未知蛋白相对分子质量

2. 双向电泳

双向电泳(two-dimensional electrophoresis)是一种将等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis,IFE)与 SDS-PAGE 结合的分辨率更高的一种电泳(图 2.25)。





(b)

图 2.25 双向电泳

(a) 双向电泳过程示意图,先进行 IFE,然后将第一向胶加到第二向凝胶上,进行 SDS-PAGE,电泳后进行染色;(b) *E. coli* 裂解液的 IFE/SDS-PAGE 双向电泳图

IFE是利用在电场作用下两性电解质(ampholytes)溶液在聚丙烯酰胺凝胶内沿电场方向制造一个pH梯度。两性电解质是一组低分子量的脂肪族多氨基、多羧基化合物的混合物,它们的等电点各不相同。当蛋白质样品在这样凝胶上电泳时,蛋白质将迁移至与它的pI相一致的pH处停止,结果凝胶上将会分布着不同等电点的蛋白质。

双向电泳首先进行IFE,然后将凝胶平放到第二向胶(含有SDS的聚丙烯酰胺凝胶)的顶端,进行SDS-PAGE。双向电泳凝胶经染色蛋白呈现二维分布图,水平方向反映出蛋白在pI上的差异,垂直方向反映出它们在相对分子质量上的差别。所以双向电泳可以将相对分子质量相同而等电点不同的蛋白质以及等电点相同而相对分子质量不同的蛋白质分开。

2.7 蛋白质氨基酸序列测定

蛋白质氨基酸序列测定主要包括确定多肽链的N端和C端氨基酸残基,测定多肽链的氨基酸组成,测定肽段氨基酸序列,给出整个氨基酸序列及确定二硫键位置等步骤。

1. 确定多肽链N端和C端氨基酸残基

利用与α-氨基反应试剂,例如通过丹磺酰氯与肽链的N端氨基酸的α-氨基反应形成丹磺酰肽。经酸水解生成惟一一个丹磺酰修饰的N端残基,然后利用色谱法分离该修饰残基,并通过荧光测定鉴定该残基。

鉴定多肽N端的同时也可确定蛋白质含有的多肽链的数目,因为如果一个蛋白质是由两个肽链组成,那么N端残基测定时会出现两个修饰的氨基酸残基。例如,在鉴定胰岛素N端时,测得了Gly和Phe两种残基,说明胰岛素是由两条不同的肽链构成的。C端残基测定最有效的方法是羧肽酶法,羧肽酶可以从肽链的C端逐一地降解,释放出游离氨基酸,然后经分离、鉴定可以确定C端残基。

2. 氨基酸组成测定

要确定蛋白质一级结构,需要预先知道这种蛋白质中都存在哪些氨基酸及它们的比例,也就是它的氨基酸组成。纯化的蛋白质都可准确测定出它的氨基酸组成。首先通过酸水解将蛋白质水解为游离的氨基酸,例如在真空、110℃条件下,用6mol/L盐酸水解16~72小时。然后用苯异硫氰酸酯(PITC)处理蛋白质水解液(pH9.0),生成苯硫脲(PTC)-氨基酸衍生物的混合物。然后混合物经配备附着短碳氢链的细硅颗粒柱的高效液相色谱(HPLC)分析,每个PTC-氨基酸衍生物按照它们的疏水特性被洗脱出来,并经测量254nm(PTC-氨基酸吸收峰波长)光吸收可以确定其浓度(图2.26)。由于不同的PTC-氨基酸衍生物以不同速率和在不同时间从柱子上洗脱下来,由此可与已知的标准鉴定各个氨基酸,而且每个氨基酸的量与它的峰下的面积成比例。利用该方法可以进行氨基酸分析,样品的量可以小到含有200个残基的1pmol蛋白质。

酸水解会使天冬酰胺转换为天冬氨酸,谷氨酰胺转换为谷氨酸。所以当使用酸水解时,层析图中的谷氨酸和谷氨酰胺的总量用Glx或Z表示,而天冬氨酸和天冬酰胺的总量用Asx或B表示。另外,酸水解也破坏色氨酸,所以还需要通过碱水解分析色氨酸的含量。

3. Edman降解

为了测定肽链的氨基酸序列通常采用Edman降解法,该方法每次都是用苯异硫氰酸酯标记多肽N端氨基酸残基,并将其从肽链上脱去,而保留余下肽段(图2.27)。

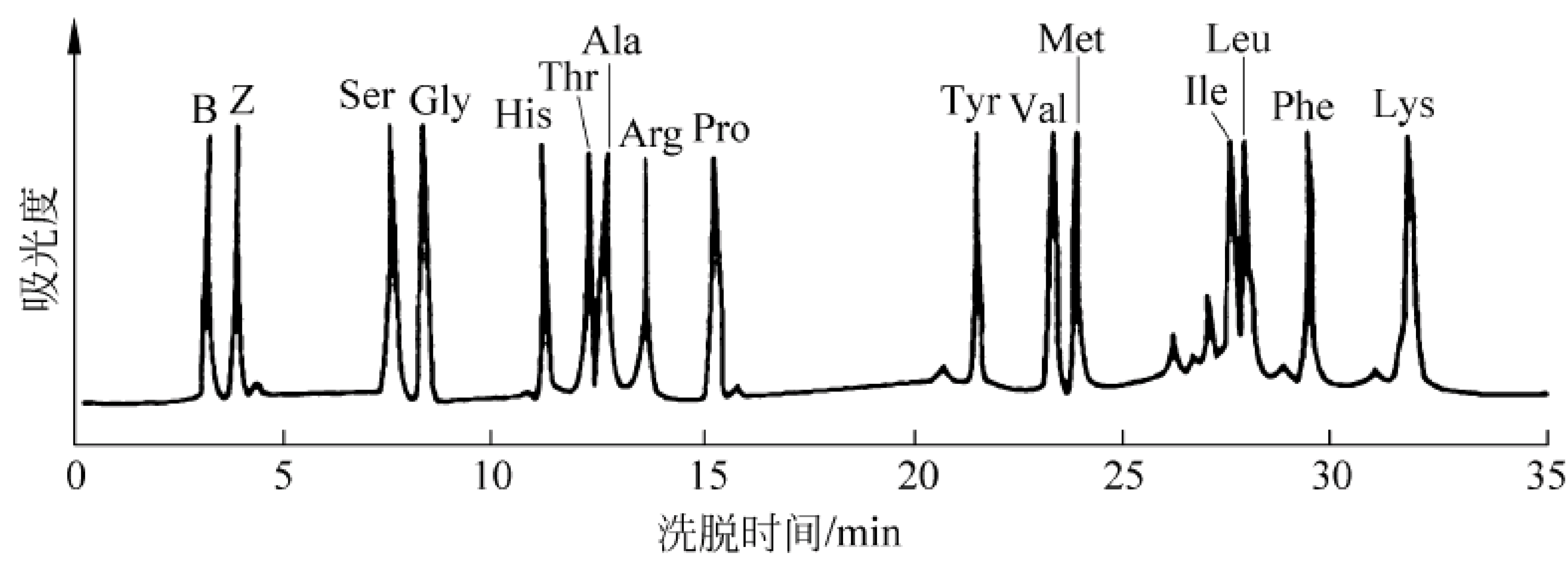


图 2.26 PTC-氨基酸混合物 HPLC 的洗脱图

图中的峰为单个字母表示的各个氨基酸的吸收峰,其中,B 为 Asp 和 Asn,Z 为 Glu 和 Gln

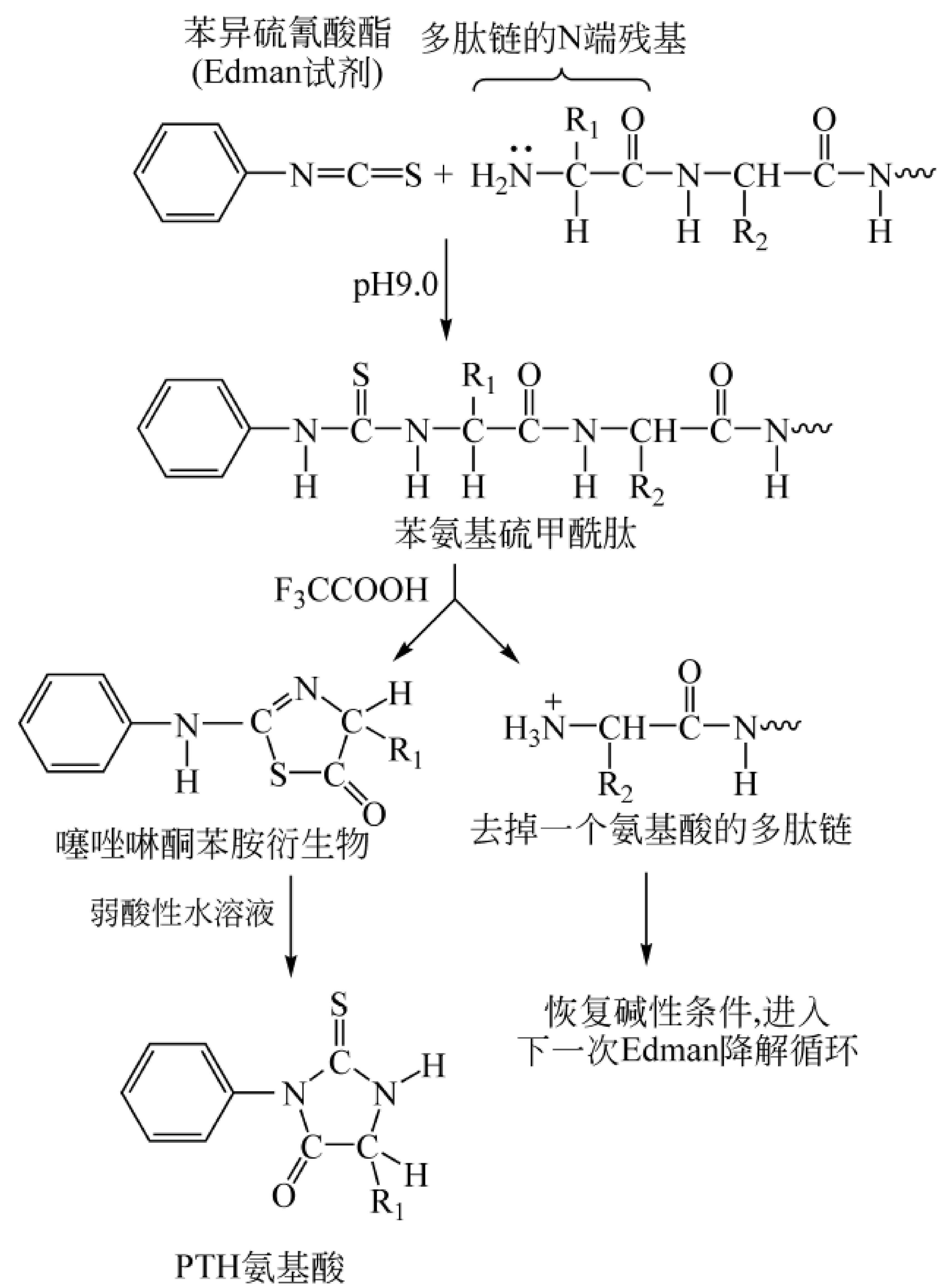


图 2.27 蛋白质测序中的 Edman 降解过程

首先在碱性条件下苯异硫氰酸酯与多肽 N 端氨基酸残基反应,形成的苯氨基硫甲酰衍生物——PTH 氨基酸从多肽上脱去,经色谱确定是哪种氨基酸。一轮过后新暴露出氨基端残基又通过同样的标记、脱去、确定等系列反应步骤依次进行残基的测定,直至整个多肽序列测定完成。现在一些实验室都备有测序仪,上述操作都是自动进行的。

当蛋白质中存在二硫键时,首先要经过处理切断二硫键,然后再进行 Edman 降解测序。图 2.28 给出了两种断开二硫键的方法。一种方法是通过过甲酸氧化,断开二硫键形成半胱

磺酸残基。另一种方法是通过 2-巯基乙醇还原，断开二硫键形成半胱氨酸残基，为防止半胱氨酸残基重新形成二硫键，紧接着与碘乙酸反应，使巯基羧甲基化(图中未给出)。

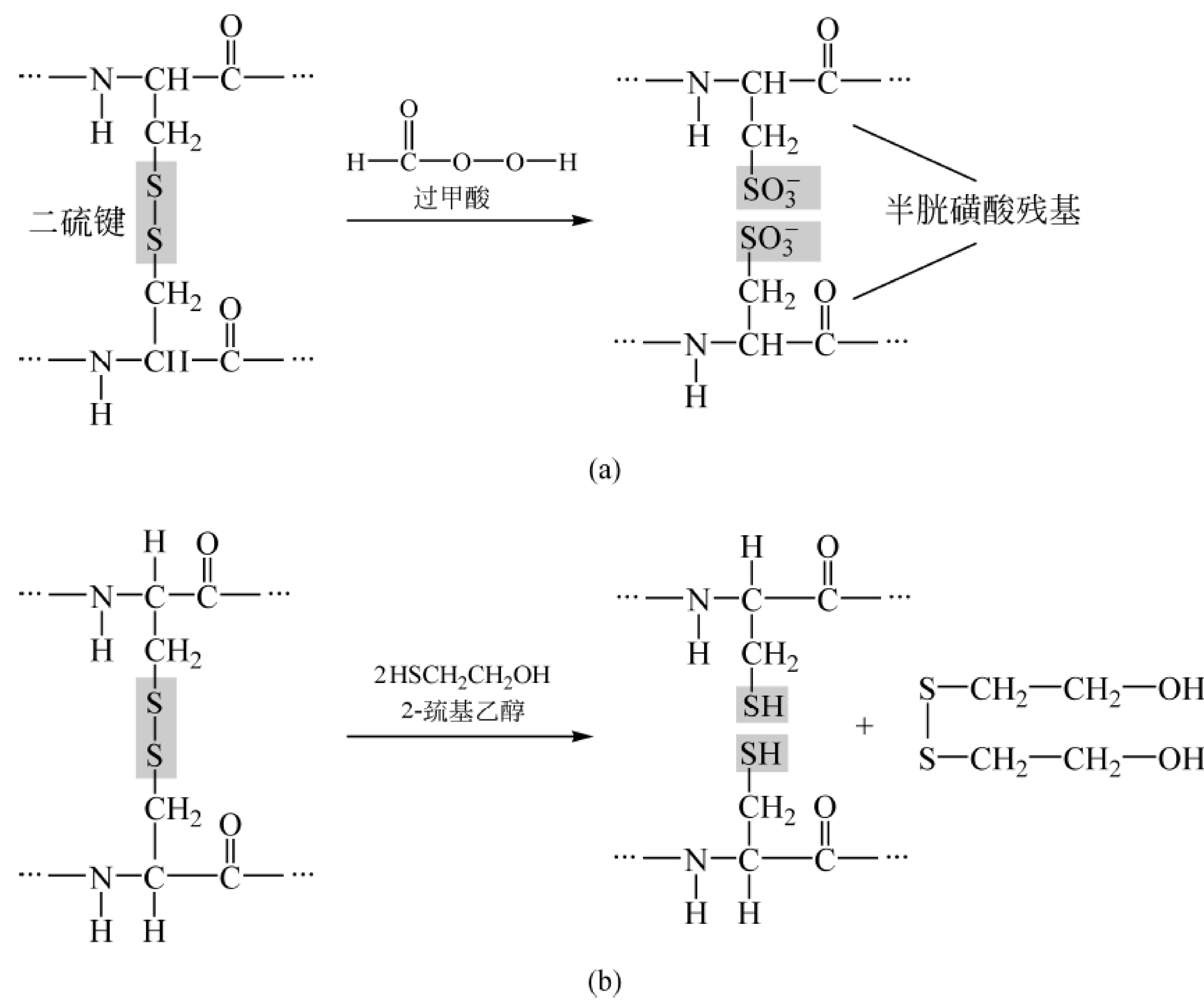


图 2.28　蛋白质中二硫键断开反应

(a) 氧化断开。过甲酸氧化，产生半胱磺酸残基；(b) 还原断开。2-巯基乙醇将二硫键还原，生成半胱氨酸残基

4. 多肽裂解和序列确定

随着多肽链长度(超过 40 个残基)增加，氨基酸测序的准确性会下降。所以要测定大的蛋白质的氨基酸序列，需要用特异的水解酶和(或)化学试剂将蛋白质分解成一套特殊肽段，然后再分别对这些片段进行 Edman 降解测序。表 2.2 列出了可将蛋白质分解为肽段常使用的一些蛋白水解酶和化学试剂溴化氰的切割位点。

表 2.2　常用的切割多肽的酶和化学试剂

酶、试剂	切割位点*
蛋白水解酶	
胰蛋白酶	Arg 或 Lys(C)
胰凝乳蛋白酶	Phe、Trp 或 Tyr(C)
凝血酶	Arg(C)
V-蛋白酶	Asp 或 Glu(C)
脯氨酰内肽酶	Pro(C)
羧肽酶	C-端氨基酸(N)
化学试剂	
溴化氰	Met(C)

*：蛋白酶或试剂识别的氨基酸残基位点，切割如发生在残基的羧基端用(C)表示，如发生在氨基端用(N)表示

溴化氰(CNBr)可以特异与多肽链中的蛋氨酸残基反应生成一个 C 端为高丝氨酸内酯的肽和一个带有新的 N 端残基的肽(图 2.29)。

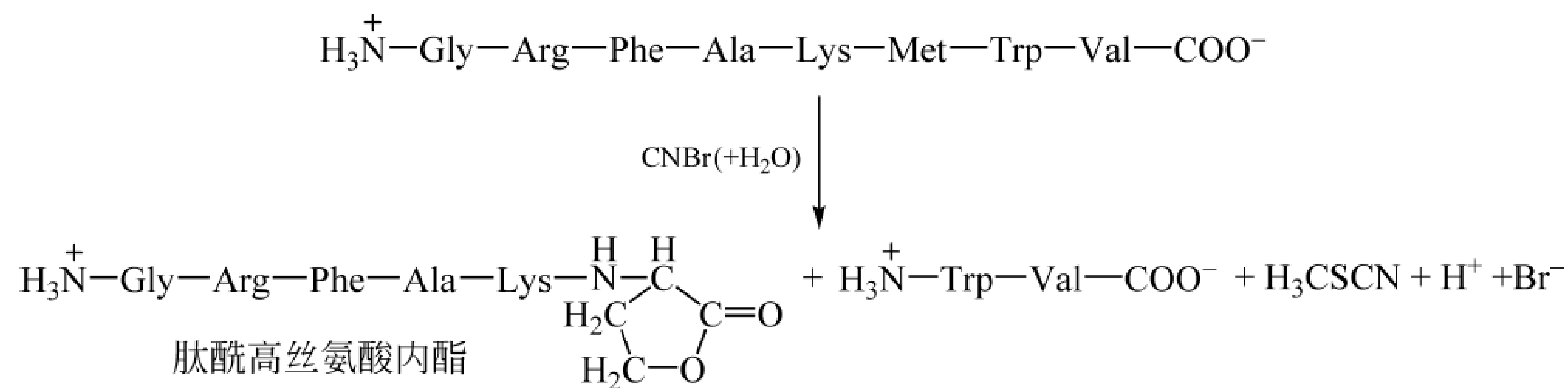


图 2.29　溴化氰裂解多肽链

胰蛋白酶(trypsin)特异地催化赖氨酸残基和精氨酸残基羧基侧肽键的水解；胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)特异地催化苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸 3 种芳香族氨基酸残基羧基一侧肽键的水解。图 2.30 给出了同一个肽链分别用胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶水解的结果。

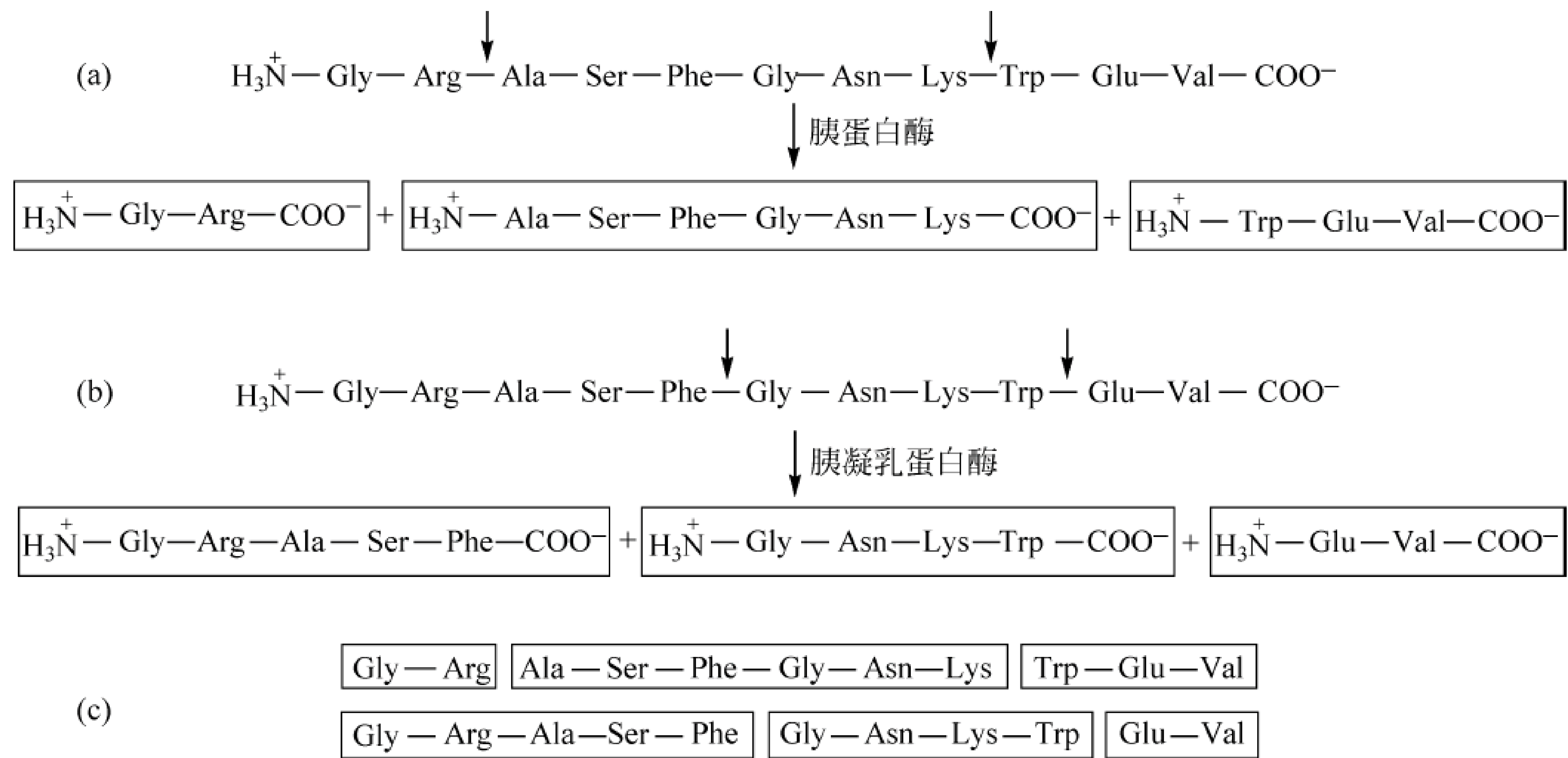


图 2.30　两种蛋白酶水解部位

(a) 胰蛋白酶作用,产生 3 个片段;(b) 胰凝乳蛋白酶作用,产生 3 个片段;(c) 利用 Edman 降解确定每一肽段氨基酸序列,通过两套酶解肽段重叠部分推测出整个序列

蛋白质测序一般都是选择两种水解酶(其中一种也可以是溴化氰)分别将蛋白质降解生成两组肽段,这些片段可以分别通过层析或电泳等方法进行分离和收集。然后利用 Edman 降解法对分离出的两组肽段分别进行测序。利用两种酶或化学试剂切割多肽的切口不同,肽段之间的次序就很容易确定了[图 2.30(c)]。

小结

1. 蛋白质由 20 种标准氨基酸组成,每种氨基酸都含有一个 α-氨基、α-羧基和一个连接在 α-碳上的侧链(R)。除了甘氨酸不存在手性碳外,蛋白质中其他所有氨基酸都具有 *L* 构型。

2. 按照侧链基团在 pH7.0 条件下表现出的极性可以把 20 种氨基酸分为 4 类：非极性

氨基酸、极性不带电荷氨基酸、酸性氨基酸和碱性氨基酸。

3. 在 pH7.0 时氨基酸的 α-羧基带负电荷(COO^-),而 α-氨基带正电荷(NH_3^+)。可离子化的侧链的带电状态取决于 pH 和它们的 pK 值。

4. 在蛋白质中氨基酸是通过肽键连接的,氨基酸残基的序列被称为蛋白质的一级结构。

6. 利用各个蛋白质的溶解度、净电荷、大小和结合特性,可以对蛋白质进行纯化。

7. 利用像 SDS-PAGE 和质谱那样的分析技术可以揭示像分子量那样的蛋白质特性。

8. 一个蛋白质的氨基酸组成可以通过水解肽键,并利用色谱对水解物进行分析定量确定。

9. 蛋白质中二硫键可通过氧化断开,或还原断开。

10. 一个多肽链的序列可以通过 Edman 降解反应确定,该反应可将 N-端残基连续切除,并可鉴定是哪种氨基酸。

习题

1. 如果一位同学在画处于 pH7.0 的丙氨酸结构式时,氨基画成 NH_2,羧基画成了 COOH,请判断正确与否?如果不正确,那么应当怎样画?

2. 组氨酸的滴定曲线如下图所示,数字 1 至 7 表示组氨酸不同解离状态的位置。

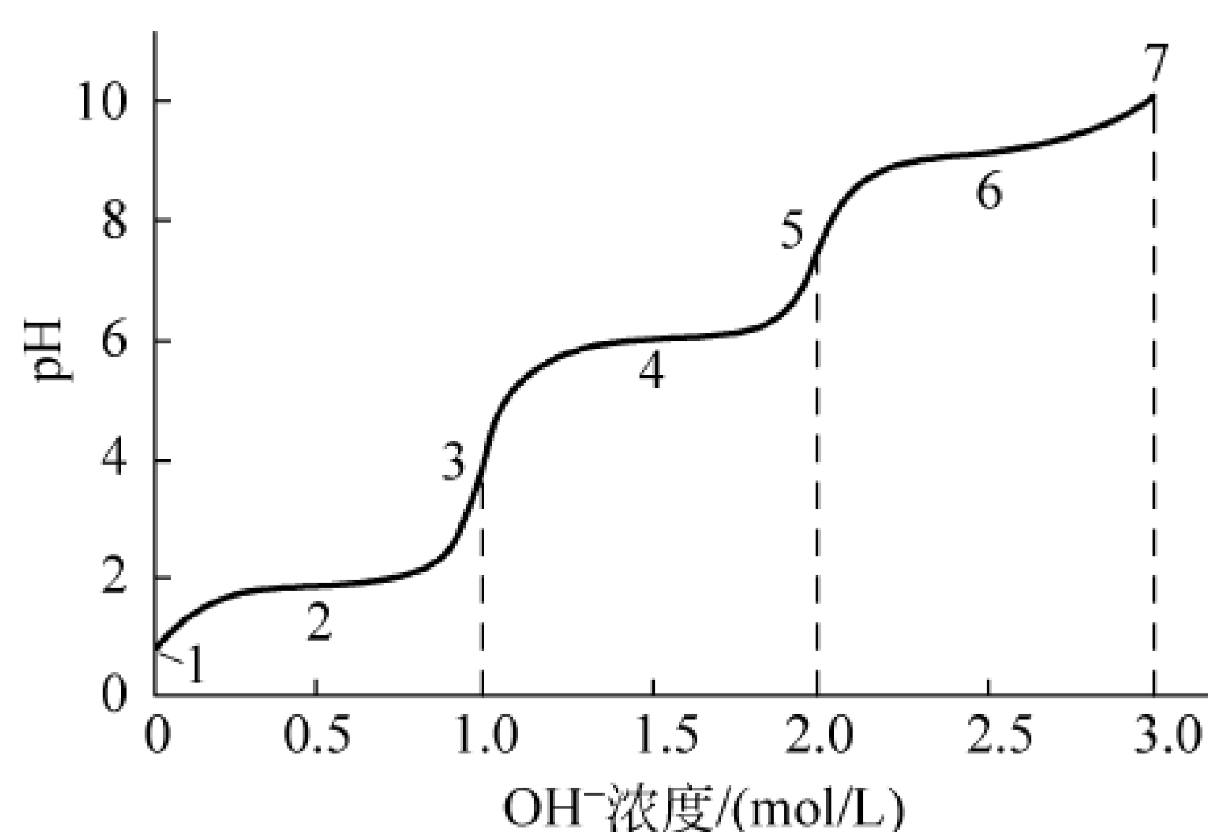
(a) 组氨酸的—COOH、侧链和—NH_3^+ 的 pK 值分别为 1.82、6.0 和 9.17,指出它们在曲线中位置。

(b) 平均净电荷为+2、+0.5、0 和−1 的点分别对应于曲线中哪一位置?

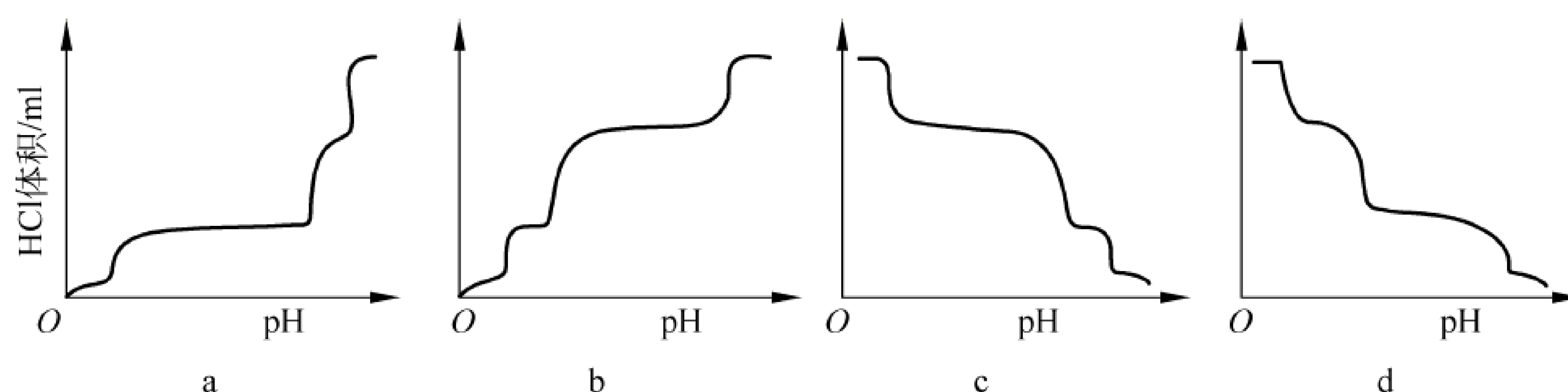
(c) 侧链基团完全被滴定的点在曲线中哪一位置?

(d) 组氨酸的 pI 指的是曲线中的哪一点?

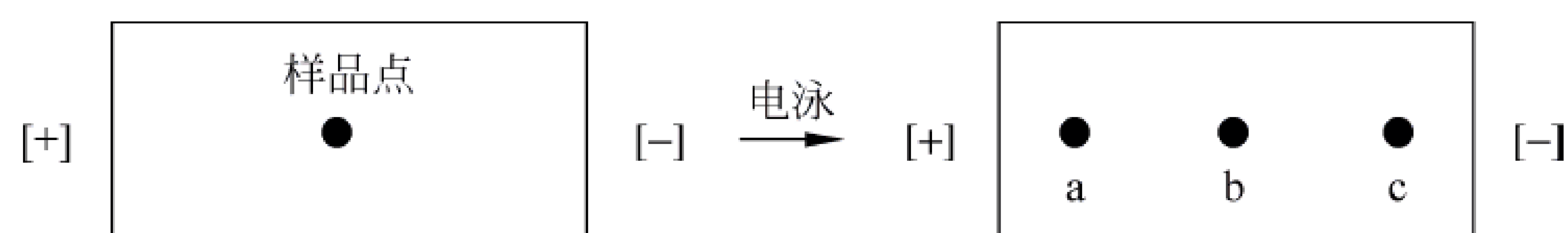
(e) 指出组氨酸能用作缓冲液的 pH 范围。



3. 某学生做了一条赖氨酸的滴定曲线,曲线坐标与常用坐标相反。下面 4 幅图中哪一个正确?



4. 有3个二肽 Asp-Phe、Gly-Cys 和 Tyr-Lys 的混合物样品,在 pH=6.0 下进行电泳,电泳结果如下,指出 a、b 和 c 点各属于哪一个二肽。



5. 胰岛素由 A 和 B 两条肽链组成。将不同生物的胰岛素分离并测序。人和鸭的胰岛素除了6个氨基酸残基(如下)不同外,其他都一致。请问人的胰岛素的 pI 比鸭的胰岛素 pI 是低还是高?

氨基酸残基:	A8	A9	A10	B1	B2	B27
人	Thr	Ser	Ile	Phe	Val	Thr
鸭	Glu	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser

6. 用 Sanger 试剂对 10g 某蛋白质进行末端分析,得到一个 DNP-氨基酸,证明为 DNP-Phe。洗脱出 5.00ml 黄色溶液,溶液在 350nm 测得的吸光度 A 为 0.60(光程 1.0cm),DNP-Phe 在 350nm 的消光系数 ε 为 $15.0cm^{-1} \cdot mol^{-1}$,问此蛋白质的最小相对分子质量为多少?

7. 为什么 SDS-PAGE 与凝胶层析基本原理都是按照多肽链相对分子质量大小分离的,但分离的顺序为什么正好相反? SDS-PAGE 中小分子走在前面,而在凝胶层析中小分子落在后面。

8. 包含赖氨酸、亮氨酸和谷氨酸的混合物要通过阳离子交换层析分离,使用 pH3.5 下的阳离子交换柱,缓冲液也为 pH3.5,哪一种氨基酸会先从柱上洗脱下来,是否还需要其他步骤洗脱氨基酸?

9. 考虑 Gly-Pro-Ser-Glu-Thr 开链与闭环(Gly 与 Thr 相连)化学性质上是否相似? 这两个肽能否通过电泳区分开?

10. 一个未知结构的新蛋白经凝胶过滤层析测得天然相对分子质量为 240 000。当有 6mmol/L 盐酸胍存在时,层析只出现一个相对分子质量为 60 000 的峰。然而当有 6mmol/L 盐酸胍和 10mmol/L 2-巯基乙醇同时存在时,层析却出现了 34 000 和 26 000 两个峰。请根据这些资料给出这个蛋白的可能结构。

3　蛋白质的三维结构

蛋白质结构分为 4 级水平(图 3.1)：一级结构和描述三维结构的二级结构、三级结构和四级结构。一级结构就像第 2 章描述的那样，指的是一个蛋白质中由肽键连接的氨基酸残基的线性序列。二级结构描述的是靠氢键维系的部分蛋白质主链有规律的折叠结构。三级结构指的是蛋白质分子处于天然折叠状态下的三维构象。四级结构描述的是具有三级结构的多肽链(称为亚基)之间以适当方式聚合所呈现出的三维结构。维持(或稳定)这三级结构水平的力主要是非共价键。

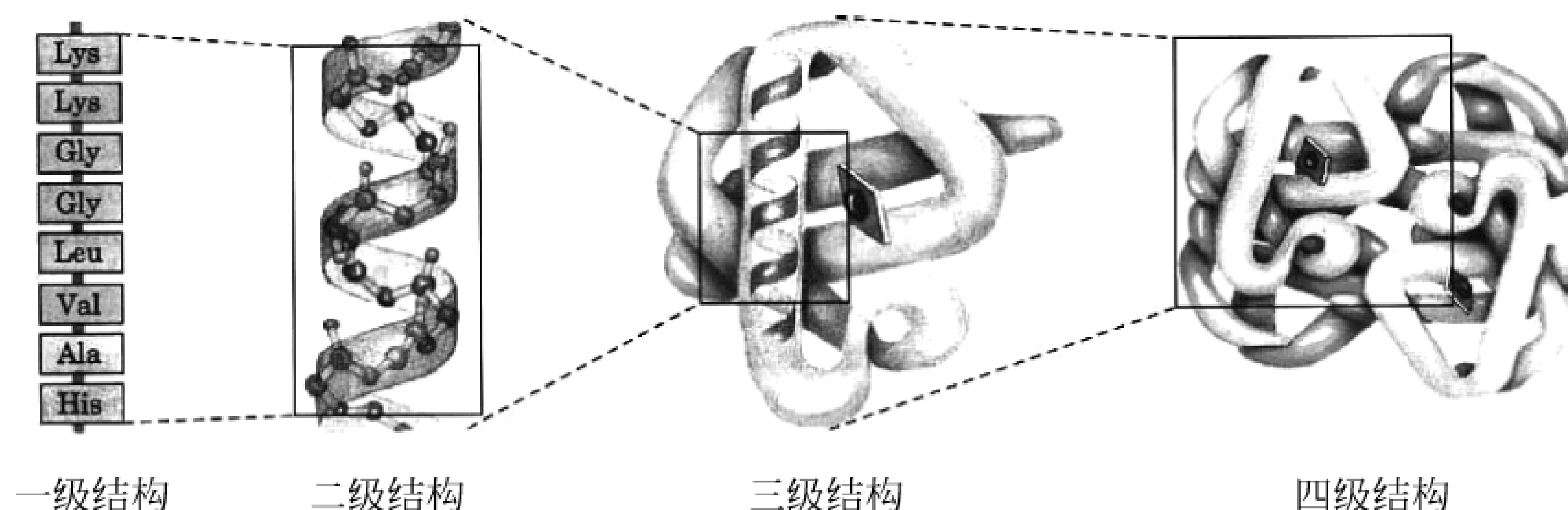


图 3.1　蛋白质 4 级结构水平

3.1　二级结构

二级结构描述的是多肽链中某一部分的构象，该部分构象表现出的是线性多肽链骨架有规律的折叠模式。其中最常见的折叠模式是下面要描述的 α-螺旋(α-helix)和 β-折叠片(β-pleated sheet)。

3.1.1　肽平面

在具体描述二级结构 α-螺旋和 β-折叠之前，首先需要了解肽键的特性。Linus Pauling 和 Robert Corey 通过对简单的二肽和三肽晶体进行 X 射线研究发现 C—N 肽键比 C＝N 双键长，但比一般的 C—N 单键短，所以使得肽键具有 40％的双键特性。而且肽键所连接的原子处于同一平面，表明羰基氧和酰胺氮间有共振或部分共用的两对电子，因此肽键以共振杂化形式表示更合适(图 3.2)。

通常将形成肽键的 2 个原子和另外 4 个取代成员：羰基氧原子、酰胺氢原子及 2 个相邻的 C_α原子称为肽基(peptide group)，6 个原子位于同一平面，所以该平面又称为肽平面(peptide plane)。由于具有双键特性的肽键不能自由旋转，所以肽平面是一个刚性平面。对于一个平面肽键，实际上存在着反式(*trans*)和顺式(*cis*)两种构型，反式构型中两个 C_α处于肽键的两侧，顺式构型中两个 C_α 处于肽键的同一侧(图 3.3)。

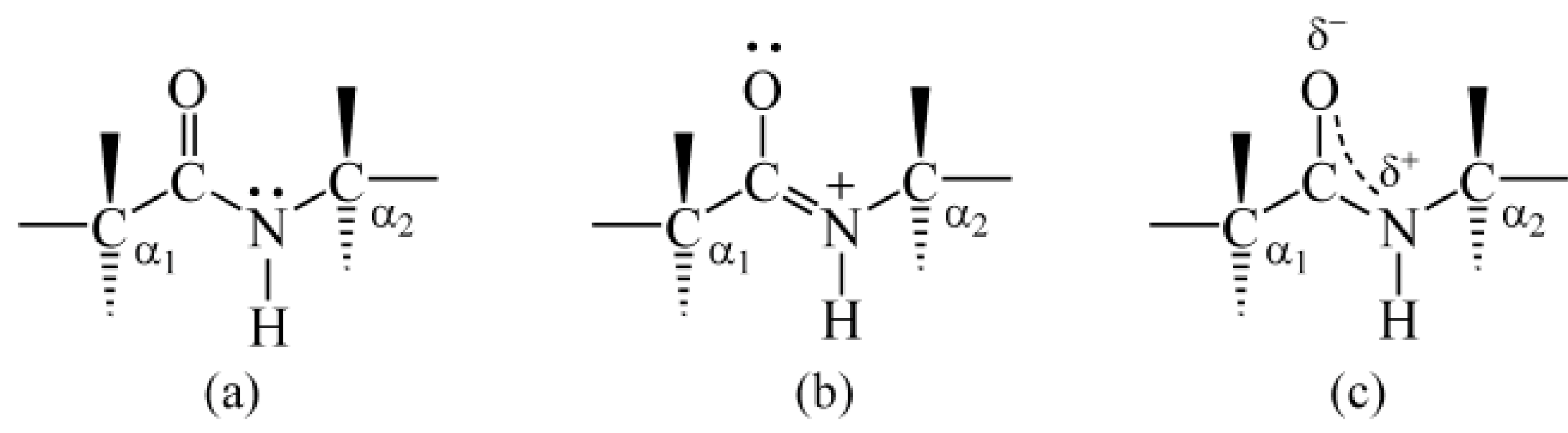


图 3.2 肽键共振结构

(a) 肽键以 C—N 形式表示;(b) 肽键以双键表示;(c) 肽键以共振杂化形式表示

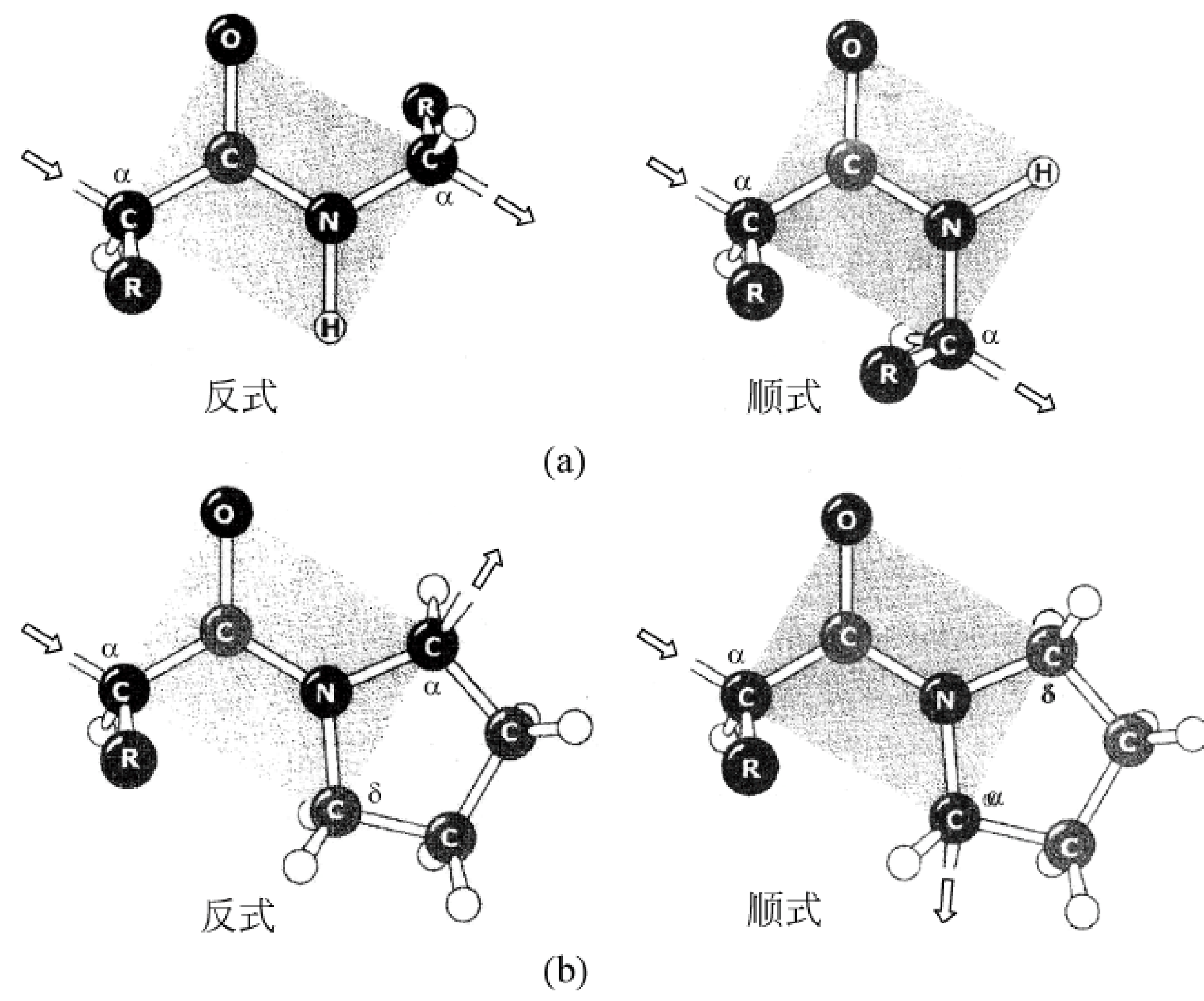


图 3.3 肽键构型

(a) 无脯氨酸参与的肽键的反式和顺式构型;(b) 有脯氨酸参与的肽键的反式和顺式构型

蛋白质中几乎所有肽键都是反式的,因为反式构型可以将相邻侧链之间的立体干扰减少到最小。但也有例外,X射线晶体分析发现蛋白质中约有6%的脯氨酸残基处于顺式构型。

一条肽链就是通过肽键连接的氨基酸聚合物,骨架由重复单位 N—C_α—C 构成,骨架结合着羰基氧、酰胺氢以及侧链 R,也可表示为由 C_α 串接起来的一串肽平面(图 3.4)。

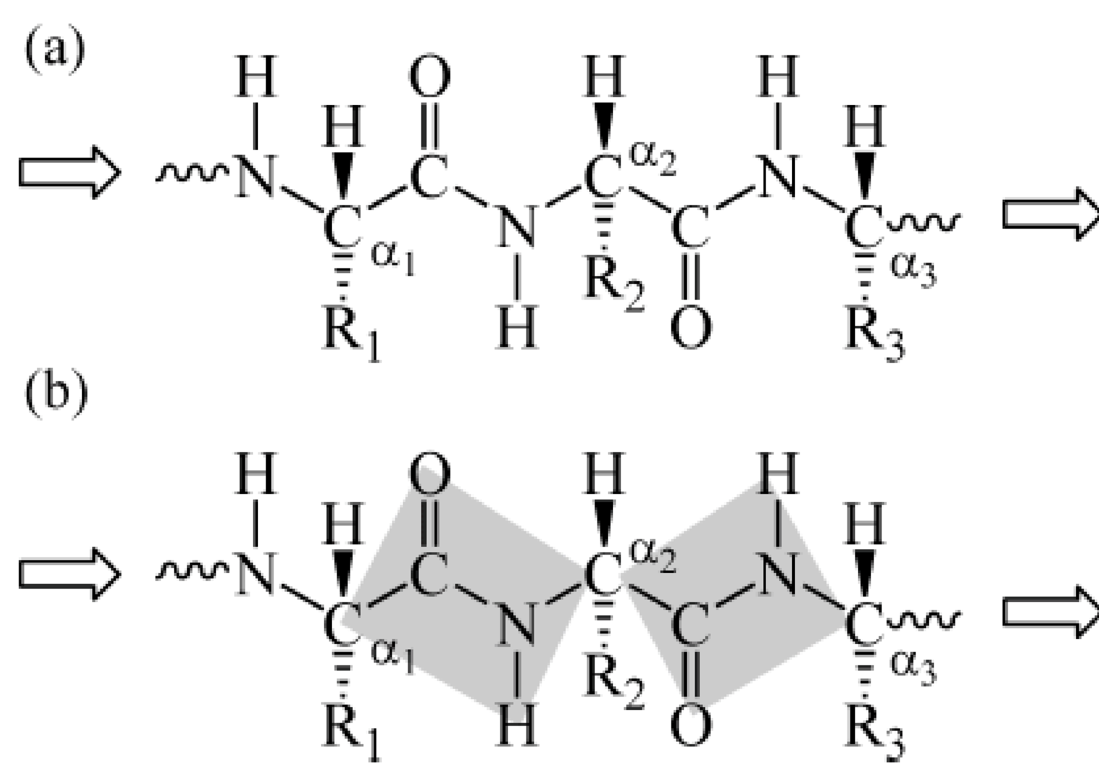


图 3.4 肽链片段简化结构

(a) 由重复 N—C_α—C 骨架构成的肽链;(b) 肽平面串接起来的肽链

实际上的蛋白质空间构象并不是简单串接的肽平面,而是一系列肽平面旋转、折叠构成的空间结构。由于肽平面不能绕肽键旋转,但可绕 C_α—C 单键和 N—C_α 键旋转,所以一个蛋白质的构象就取决于肽平面绕 C_α—C 键和 N—C_α 键的旋转。绕 C_α—N 键旋转的角度用 ϕ 表示,而绕 C_α—C 键旋转的角度用 ψ 表示,顺时针方向为正,反时针为负。

蛋白质主链构象由各个氨基酸残基绕 C_α—N 键 ϕ 和绕 C_α—C 键 ψ 的旋转角(也称为二面角)描述,理论上 ϕ 和 ψ 可以取 $-180°$ 至 $+180°$ 之间的任一个角度,但 ϕ 和 ψ 的某些组合由于会引起酰胺氢、羰基氧原子等原子之间的空间位阻,所以允许的 ϕ 和 ψ 组合形成的空间构象是有限的(图 3.5)。

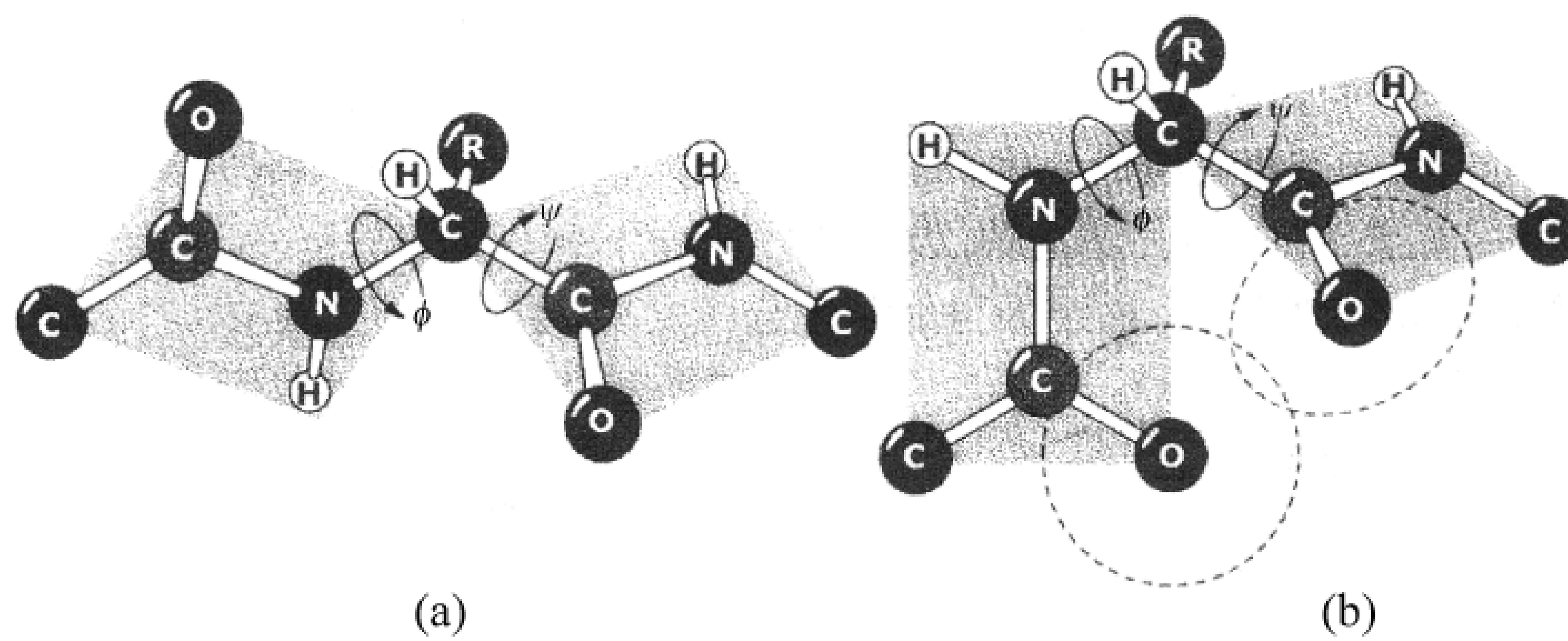


图 3.5　肽平面绕 N—C_α 键和 C_α—C 键的旋转

(a) 肽平面处于一种伸展的构象(ϕ 和 ψ 都为 180°)；(b) 肽平面处于一种不稳定的构象(ϕ 和 ψ 都为 0°)，相邻氨基酸残基的羰基氧之间存在空间位阻[虚线表示的是羰基氧原子的范德华(van der Waals)半径]

3.1.2　α-螺旋

早在 1951 年，Pauling 和 Corey 根据对一些简单小肽的 X 射线晶体图数据，提出了两个周期性多肽结构：α-螺旋和 β-折叠片，它们是许多纤维蛋白和球蛋白的主要二级结构元件。

一串刚性肽平面最可能形成的结构就是螺旋结构，被 Pauling 和 Corey 称为 α-螺旋(图 3.6)。理论上讲，一个 α-螺旋可以是右手螺旋，也可以是左手螺旋，但对于 *L*-氨基酸残

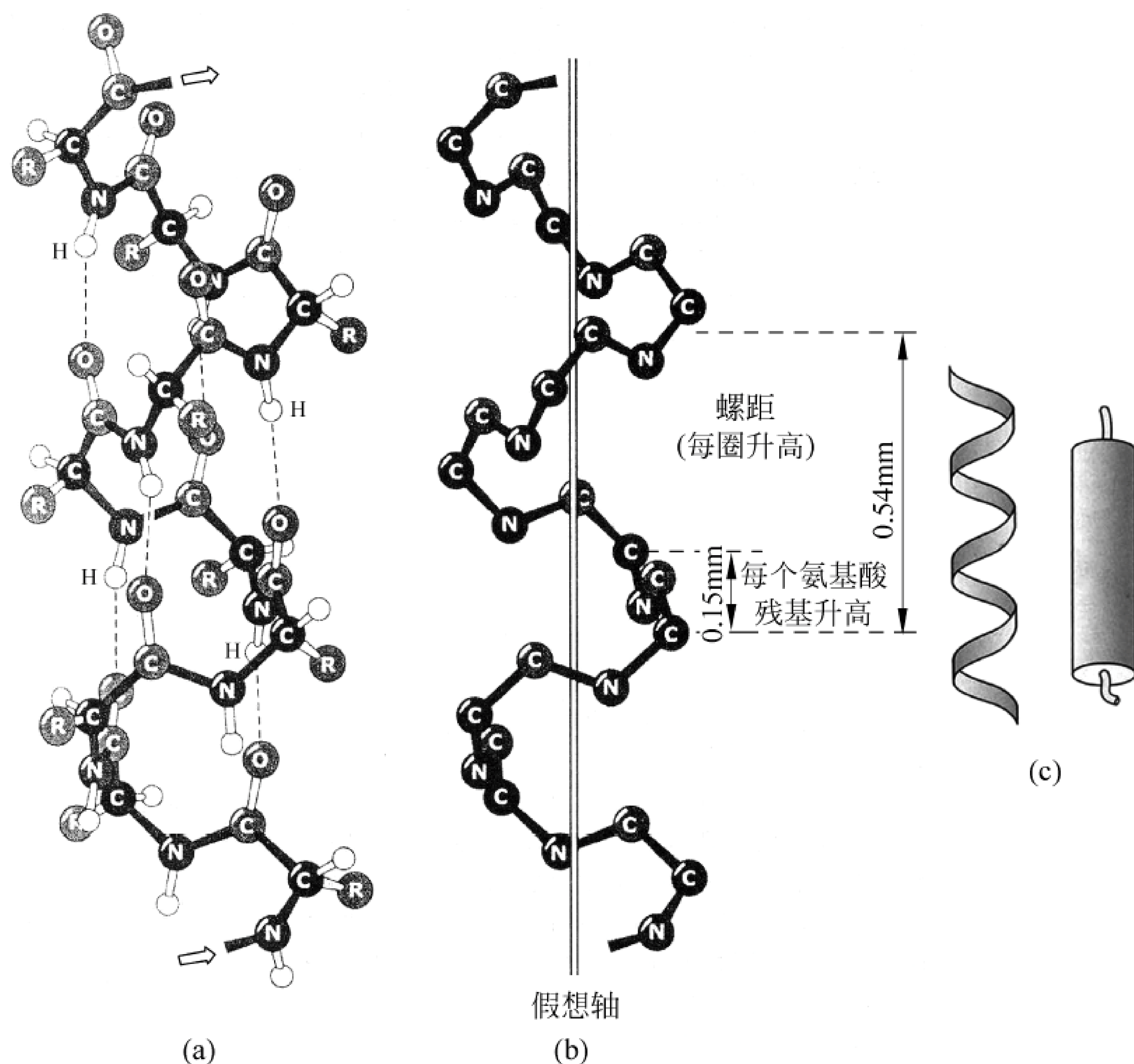


图 3.6　α-螺旋

(a) 一条带有肽平面中所有原子和侧链的肽链的 α-螺旋；(b) 只表示出肽链骨架绕假想轴的 α-螺旋；(c) 在蛋白质三维结构模型中 α-螺旋的简单表示

基构成的多肽链来说,由于羰基氧和侧链之间存在空间位阻,左手构象不稳定,因此在蛋白质中发现的α-螺旋都是右手螺旋。

在一个理想的α-螺旋中,每一个氨基酸残基绕螺旋轴上升0.15nm,每圈螺旋包含3.6个氨基酸残基,螺距为0.54nm。在α-螺旋中多肽链骨架的每个羰基氧(氨基酸残基 n)与它后面C-端方向的第4个残基($n+4$)的酰胺氢形成氢键。螺旋内的氢键几乎平行于螺旋的长轴,氨基酸残基侧链从螺旋中伸出到螺旋外,从螺旋顶部看,螺旋中间是空的。稳定α-螺旋的力是大量的链内氢键,虽然单个氢键比较弱,但α-螺旋内的大量氢键的总体效应使得α-螺旋成了最稳定的二级结构。

然而并不是所有的多肽都能形成稳定的α-螺旋,因为氨基酸残基侧链之间相互作用既可稳定螺旋结构,也可能破坏螺旋结构。例如如果肽链中有一连续的Glu或Asp区,这一片段在pH7.0时都不能形成α-螺旋。因为相邻酸性氨基酸侧链带负电荷而相互排斥,破坏了α-螺旋中氢键的稳定作用。同样道理,在pH7.0时连续的Lys或Arg区也不能形成α-螺旋,但此时起破坏作用的是带正电荷的相邻碱性氨基酸间的相互排斥。

脯氨酸基本上不会出现在α-螺旋中,因为它的氮原子是刚性环的成员,不可能绕 N-C_α 旋转,而会在螺旋中引入一个结节。另外一个原因是脯氨酸由于形成肽键后酰胺氮上缺少氢原子,使得脯氨酸不能参与α-螺旋的氢键网络,这也导致脯氨酸很少出现在α-螺旋中。

影响α-螺旋稳定的还有一些其他因素,如相邻残基R基团的体积,过多Gly出现也不利于α-螺旋的形成,因为它的侧链只是一个氢原子。

毛发、角以及指甲中的α-角蛋白几乎都是由α-螺旋组成的纤维蛋白。图3.7只是给出了毛发结构层次的示意图。α-角蛋白基本结构元件是由2个α-螺旋左手相互缠绕形成双链卷曲螺旋(two-chain coiled coil),两列彼此错开的首尾相连的双链卷曲螺旋组装成1根原丝(protofilament),2根原丝形成一根原纤维(protofibril),4根原纤维再形成1根微纤维(microfibril),更高级结构还不十分清楚。

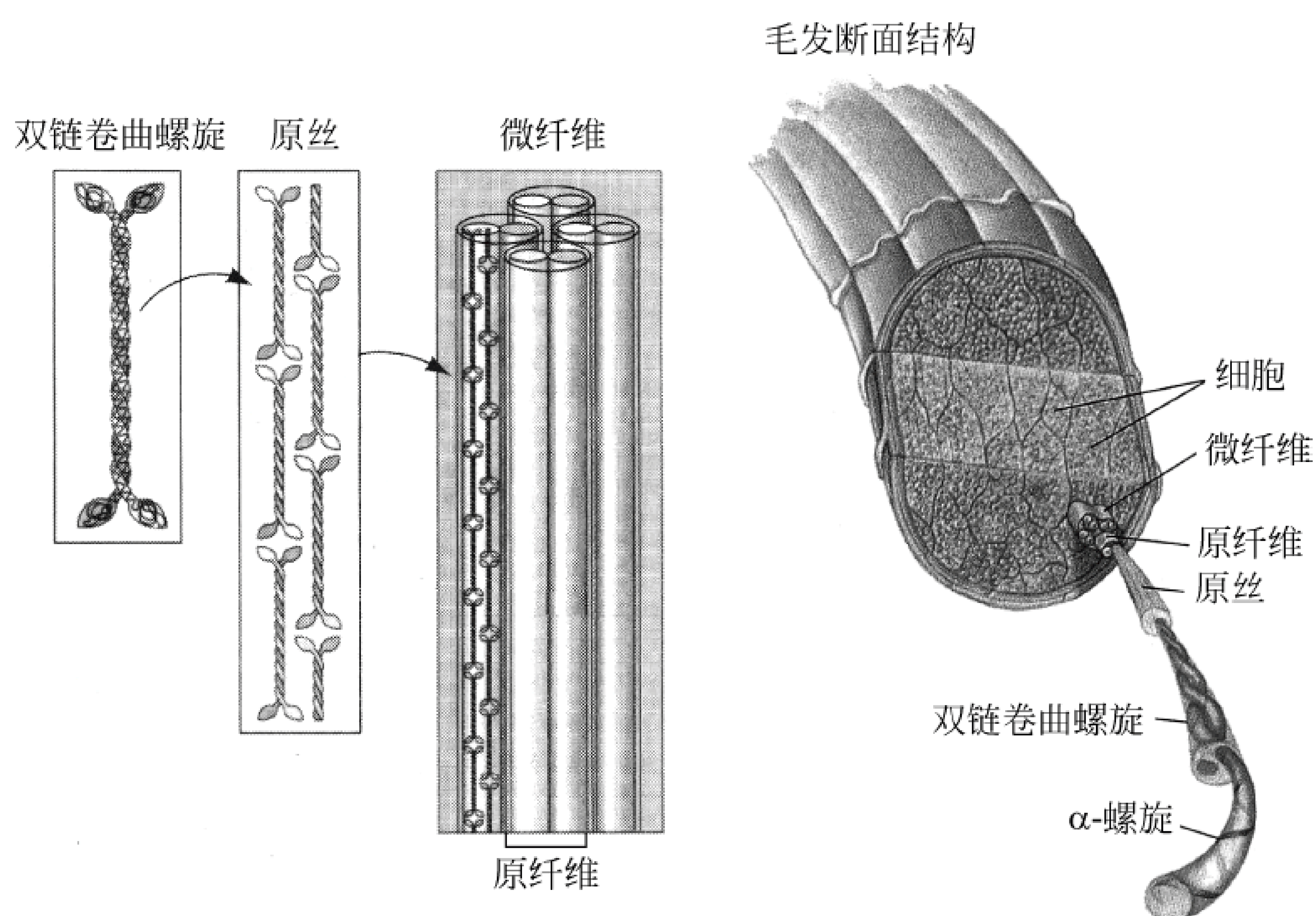


图3.7 毛发结构层次

α-角蛋白富含 Cys 残基，通过形成二硫键连接相邻肽链。头发经硫醇处理，可使二硫键断开，变成—SH。然后卷成想要的波形后，再用氧化剂处理，由于—SH 错接形成二硫键，可使卷曲的头发定型，这就是“烫发”的原理。

3.1.3　β-链和 β-折叠片

另一常见的二级结构是一类包括 β-链和 β-折叠片（也称为 β-片层）的 β-结构。β-链是几乎完全伸展的部分多肽链。β-链中的每个氨基酸残基占据的长度为 0.32～0.34nm（α-螺旋中每个残基占 0.15nm）。当多条 β-链肩并肩排列时就形成了 β-折叠片。在 β-折叠片构象中肽链骨架呈 Z 字形（图 3.8）。

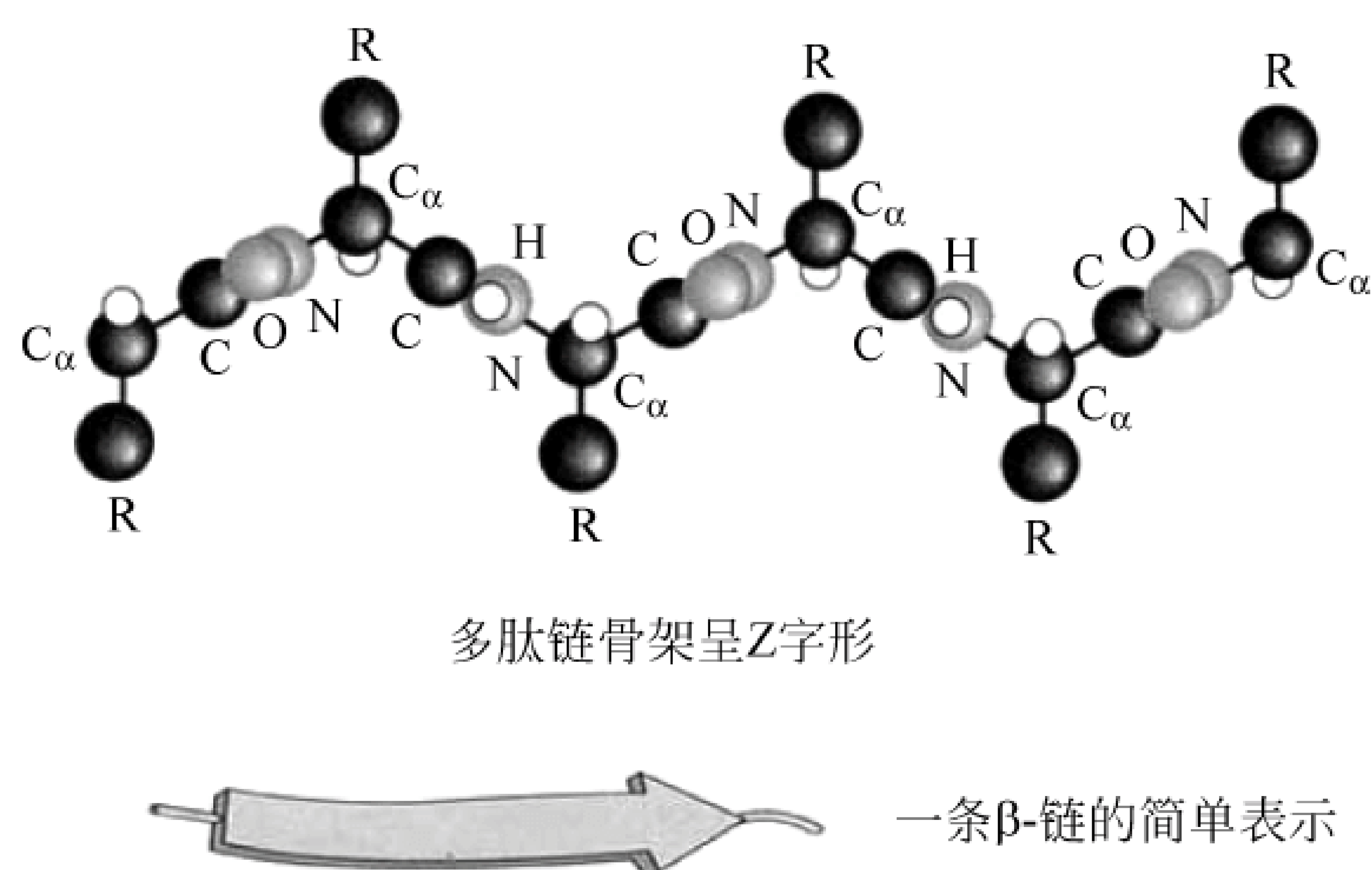


图 3.8　β-折叠片构象中 Z 字形 β-链

由于 β-链靠自身很难保持稳定，所以蛋白质基本上不含孤立的 β-链。而 β-折叠片由于相邻肽段羰基氧和酰胺氢之间形成的氢键而很稳定。因此，在蛋白质中 β-结构区中发现的几乎都是 β-折叠片。能够形成氢键的 β-链可以是不同肽链中的片段，也可以是同一条链的不同片段。β-折叠片中 β-链可以平行排列，即多肽链的方向都是从 N-端到 C-端方向（图 3.9）；或反平行排列，即一个片段是 N-端到 C-端方向，相邻的另一片段是 C-端到 N-端方向（图 3.10）。

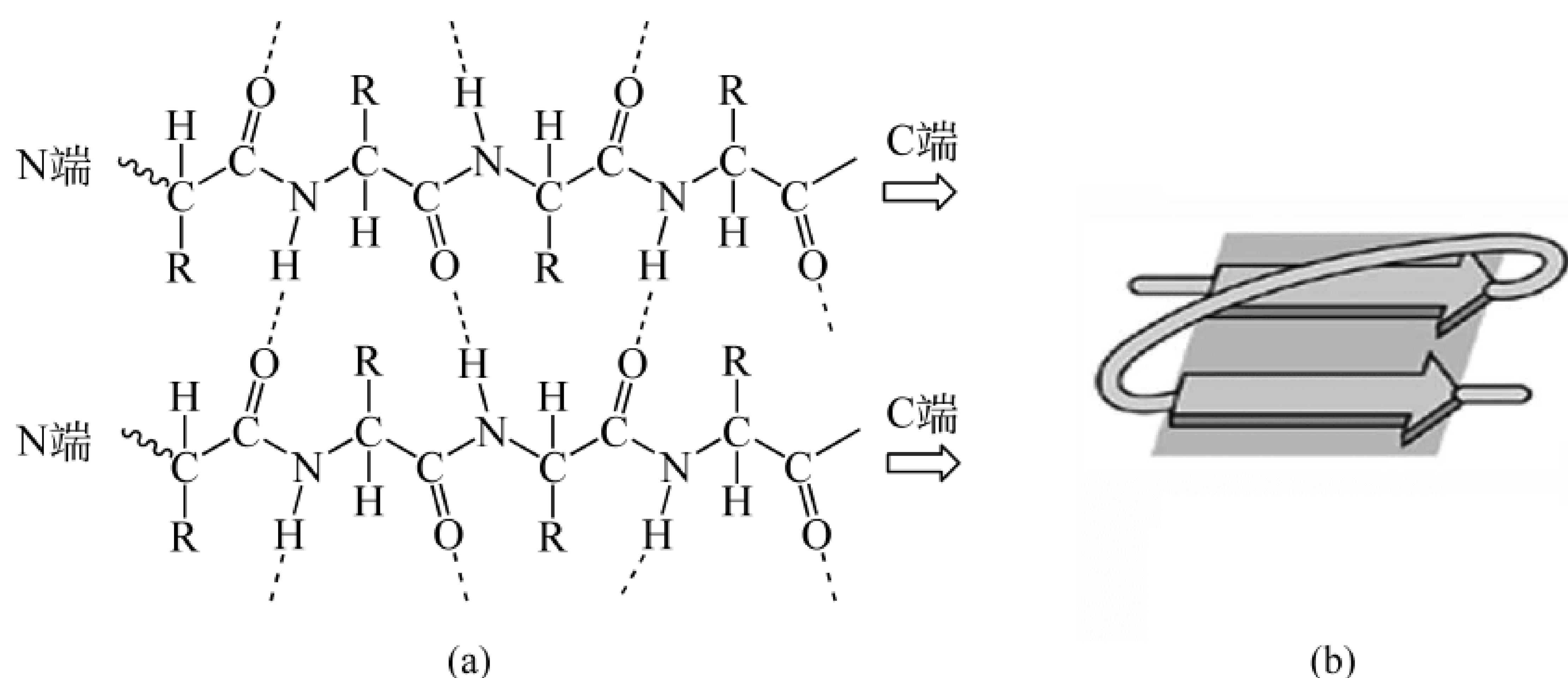


图 3.9　平行 β-折叠片

（a）两条 β-链构成的平行 β-折叠片；（b）平行 β-折叠片的飘带模式图

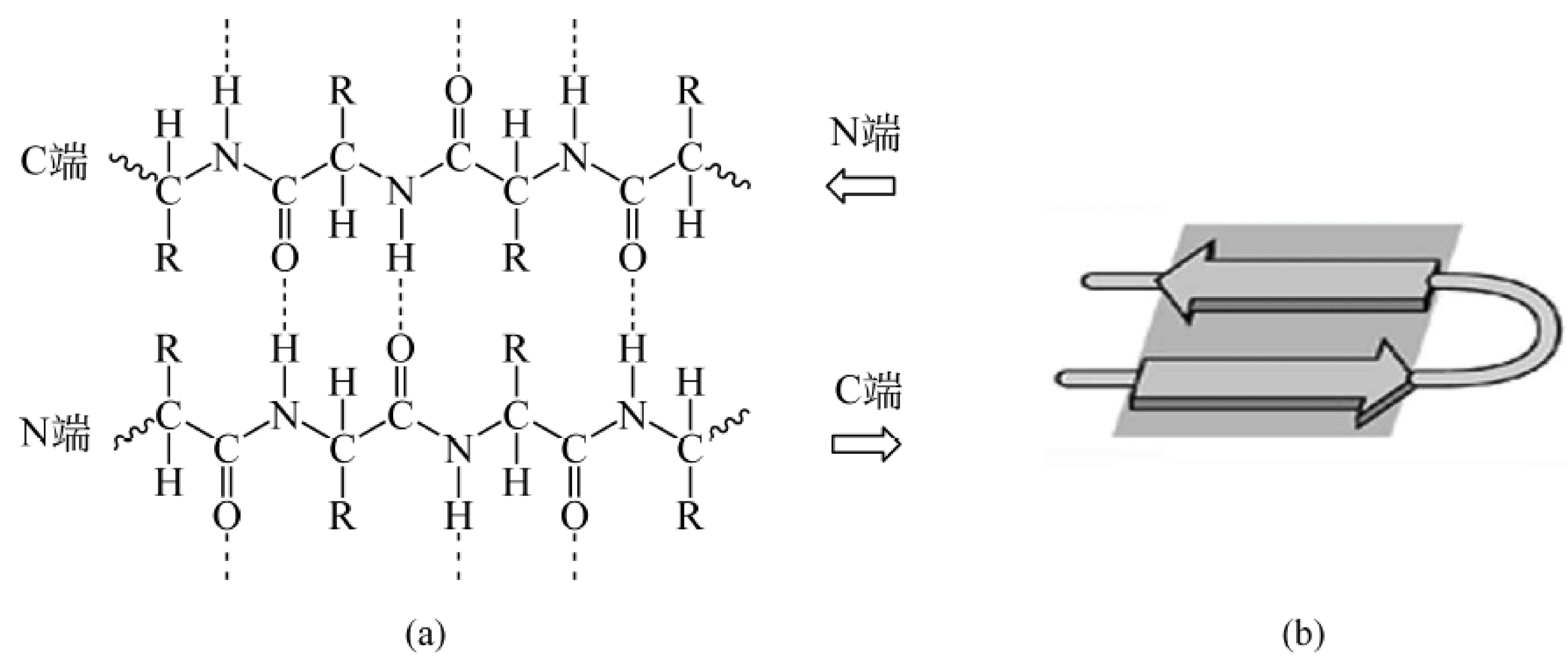
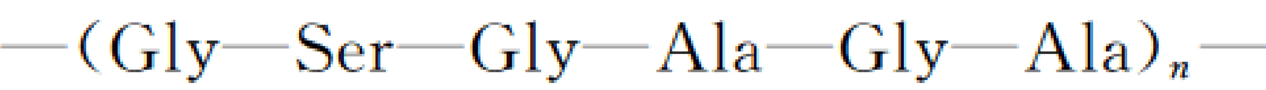


图 3.10　反平行 β-折叠片

(a) 两条 β-链构成的反平行 β-折叠片；(b) 反平行 β-折叠片的飘带模式图

从图 3.10 可看到，当 β-链反平行排列时，氢键几乎垂直于伸展的多肽链，但要注意的是在反平行 β-折叠片中，一个残基的羰基氧和酰胺氢与另一条链上的一个残基形成氢键。而在平行 β-折叠片中，每个残基与相邻链上的两个不同残基形成氢键，而且氢键并不与延展的肽链垂直。平行 β-折叠片的稳定性比反平行差，这可能是由于氢键扭曲的原因。β-折叠片的平面形肽基彼此呈一定角度，由于角度方向不同，使得氨基酸侧链交替地出现在折叠的上面和下面。一个典型的 β-折叠片都含有 2 条或 2 条以上 β-链，最多的有 15 条 β-链，每条 β-链平均含有 6 个氨基酸残基。

蚕丝主要成分是丝心蛋白，主要二级结构是反平行 β-折叠片，含有 6 残基的重复序列：


—(Gly—Ser—Gly—Ala—Gly—Ala)$_n$—

由于 β-折叠片结构中的氨基酸残基的侧链交替地伸向 β-折叠片平面的上面和下面，所以甘氨酸残基的侧链氢都位于 β-折叠片平面的一侧，而丙氨酸和丝氨酸残基的甲基侧链和羟甲基侧链都位于另一侧，这使得 β-折叠片紧密地堆积在一起(图 3.11)。丝织品的伸缩性很小，因为二级结构为 β-折叠片结构，已经近乎完全伸展了。丝织品很柔软，因为堆积的 β-折叠片只是靠侧链之间的范德华力结合在一起的。

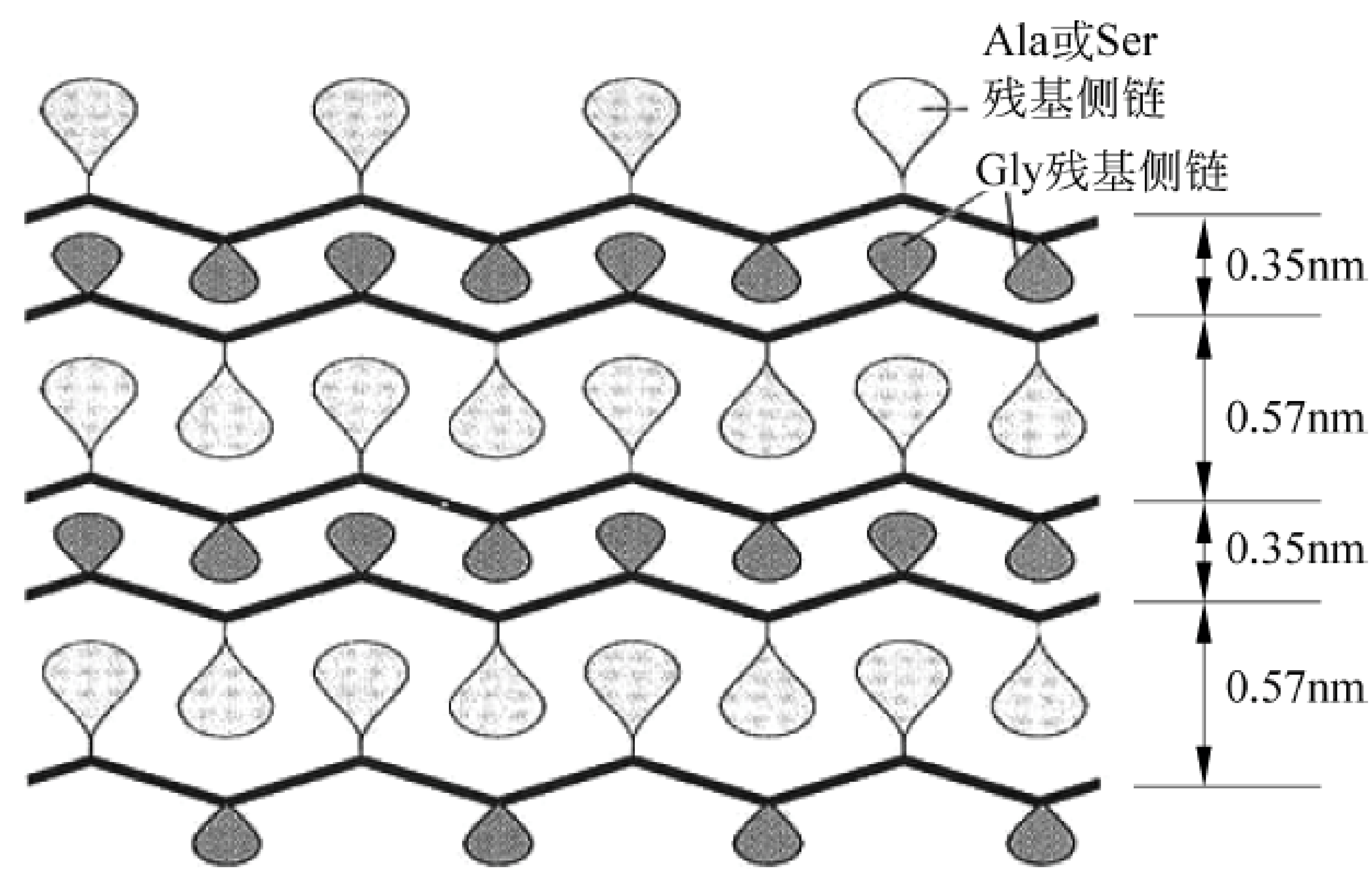


图 3.11　丝心蛋白 β-折叠片横断面图

上一个片层的 Gly 残基侧链与下一个片层的 Gly 残基侧链交替嵌合，Ala 或 Ser 残基侧链也以同样方式交替嵌合

3.1.4　转角

在紧凑折叠的球蛋白中，还存在着连接 α-螺旋和(或)β-折叠的使肽链改变走向的连接肽段，它们往往形成有规律的转角(reverse turn)，有时由于连接反平行 β-折叠中相邻肽段末端，也称为 β-转角(β-turn)。

转角主要有Ⅰ型转角和Ⅱ型转角(图 3.12)。两种转角都是由 4 个氨基酸残基组成，第 2 位残基都是 Pro。Ⅱ型转角中第 3 位残基通常是 Gly，而且连接第 2 位残基和第 3 位残基的肽平面相对于Ⅰ型转角翻转了 180°。两种类型转角都是通过第 1 位残基羰基氧与第 4 位残基酰胺氢形成的一个氢键稳定的。

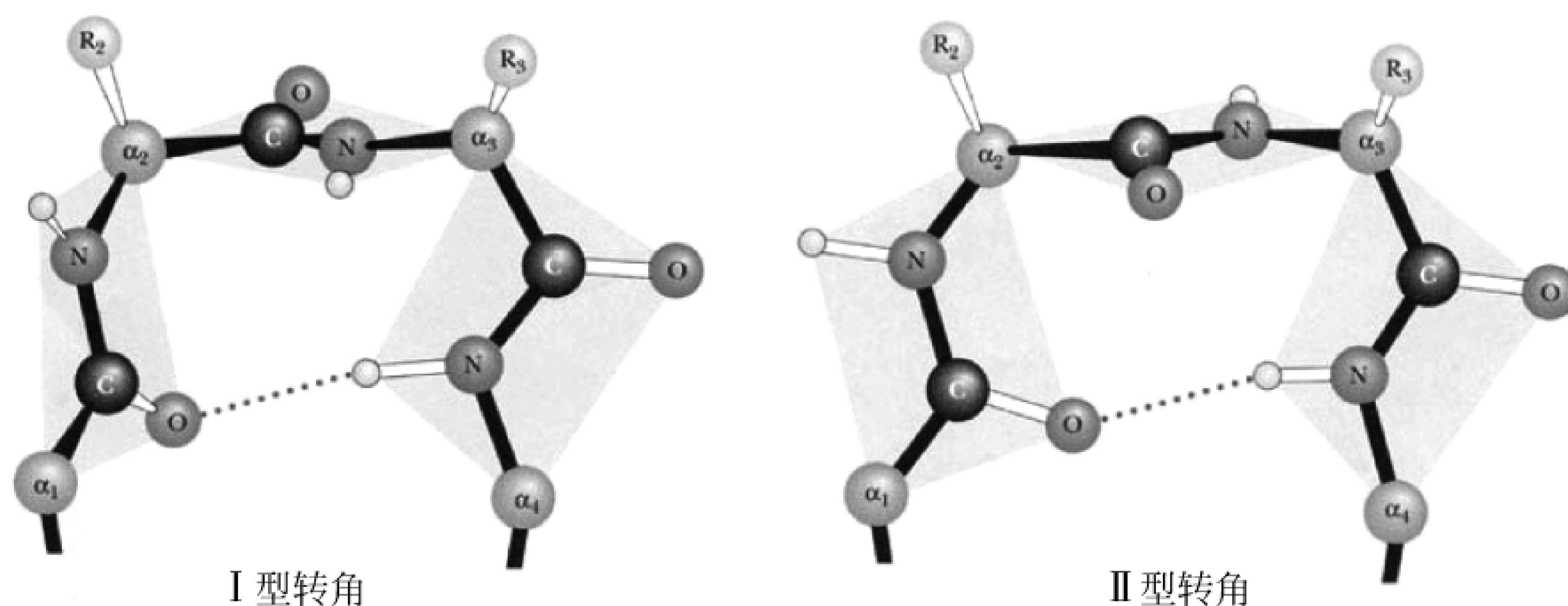


图 3.12　两种类型转角

3.1.5　胶原

胶原或称胶原蛋白(collagen)是动物结缔组织最主要的蛋白质，常出现在腱、软骨、骨、牙、皮肤、眼角膜和血管等部位。胶原不溶于水，具有很高的拉伸强度，与 α-角蛋白一样也属于纤维蛋白。胶原有很多类型，常见的有Ⅰ型胶原、Ⅱ型胶原和Ⅲ型胶原，Ⅰ型胶原通常由两个相同的称为 α_1(Ⅰ)的肽链和另外一个称为 α_2(Ⅰ)的肽链组成，骨、腱和皮肤中Ⅰ型胶原含量丰富。Ⅱ型胶原(软骨中富含)和Ⅲ型胶原(血管富含)都是由 3 个相同的肽链组成。

胶原也是一种具有螺旋结构的生物分子，但存在着一种不同于 α-螺旋的特殊二级结构——左手螺旋。胶原的基本结构元件是原胶原分子，是由 3 股左手螺旋肽链卷曲互相盘绕形成的右手超螺旋分子。三螺旋中每股每一圈螺旋约有 3.3 个残基，螺距为 0.95nm，即每一个氨基酸残基沿着 3 股螺旋轴上升的距离约为 0.29nm(图 3.13)。

从图 3.13(a)可看到胶原纤维电镜照片呈明暗带交替的条纹图案，重复的每个明暗周期距离为 d，其中明带(重叠区带)占 0.4d，而暗带(空穴区带)占 0.6d。因胶原类型不同，d 值也不一样，例如Ⅰ型胶原中 d 为 68nm，则重叠区带就为 28nm，空穴区带为 40nm。由于空穴区存在，一些糖，例如葡萄糖等可与羟赖氨酸共价连接，这些糖可能有组织胶原纤维组装的作用。另外，空穴区可能是骨矿化成核部位。

明暗带交替出现从图 3.13(b)中可得到解释，在胶原纤维中原胶原分子沿纤维轴向首尾相随，但不是相接，而是留有一个空隙，相邻分子彼此有规律错位、平行排列，形成纤维束。从垂直纤维方向观察，纤维束中就存在着重叠区和空穴区，两个区的电子密度不同，结果电镜照片形成了明暗相间的条纹。

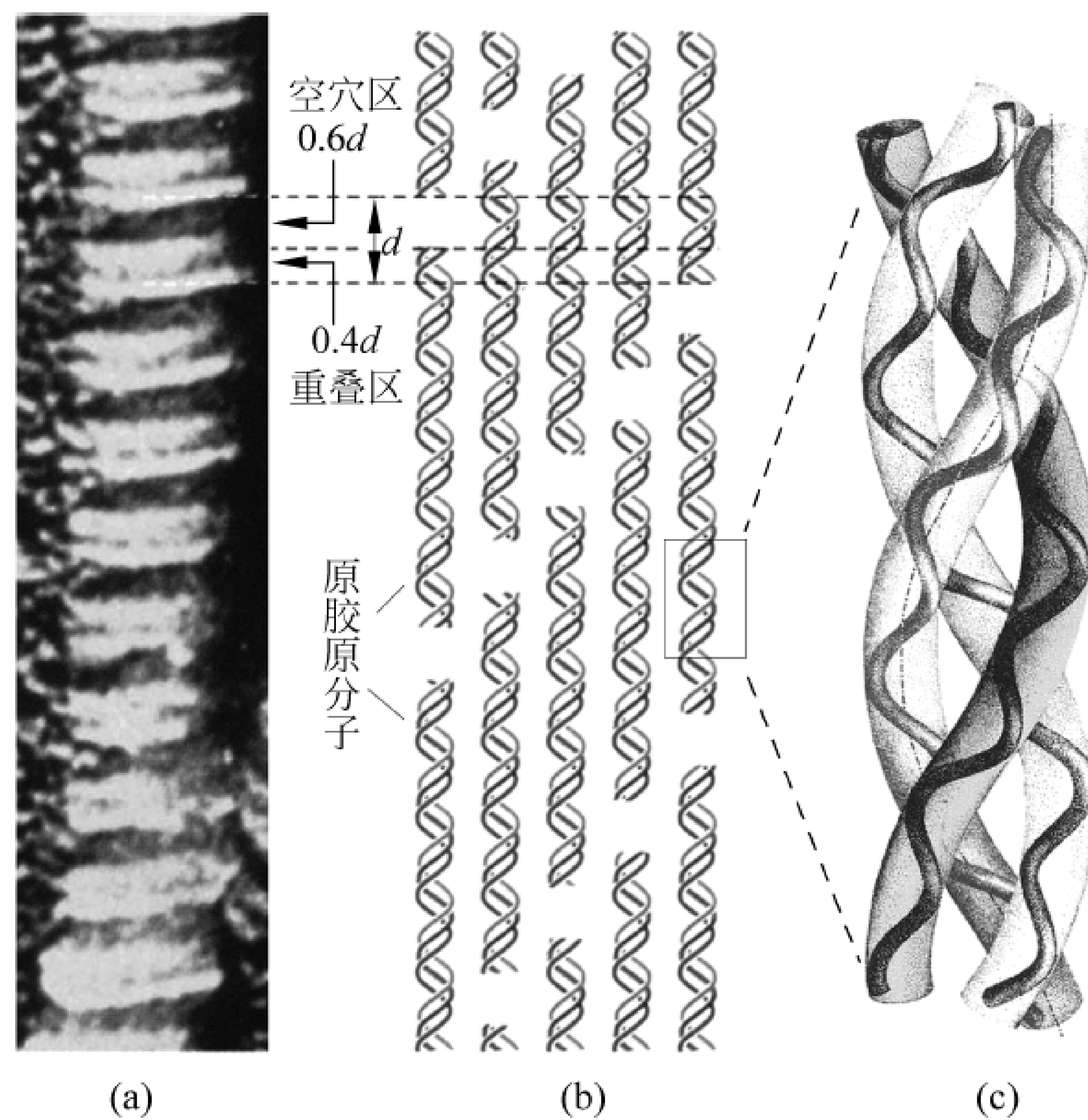


图 3.13 胶原纤维结构

(a) 胶原纤维电镜照片呈明暗带交替图案；(b) 胶原纤维中原胶原分子的排列；(c) 原胶原分子局部右手三螺旋，每股都是左手螺旋

一级结构分析发现胶原具有重复的-Gly-*X*-*Y*-序列，其中 *X* 通常为 Pro 残基，而 *Y* 是 4-羟脯氨酸(Hydroxyproline，Hyp)残基，有时还会出现 5-羟赖氨酸(Hydroxylysine，Hyl)残基(图 3.14)，它们分别是在脯氨酰羟化酶和赖氨酰羟化酶催化下由 Pro 和 Lys 合成的。由于重复出现 Pro 和 Hyp，胶原不可能形成 α-螺旋，另外 Gly 过多也不利于 α-螺旋形成，但这样重复序列却促成了每圈约 3 个残基的特殊的左手螺旋构象，而且 3 条这样的肽链再按右手卷曲缠绕，形成了右手三螺旋构象。

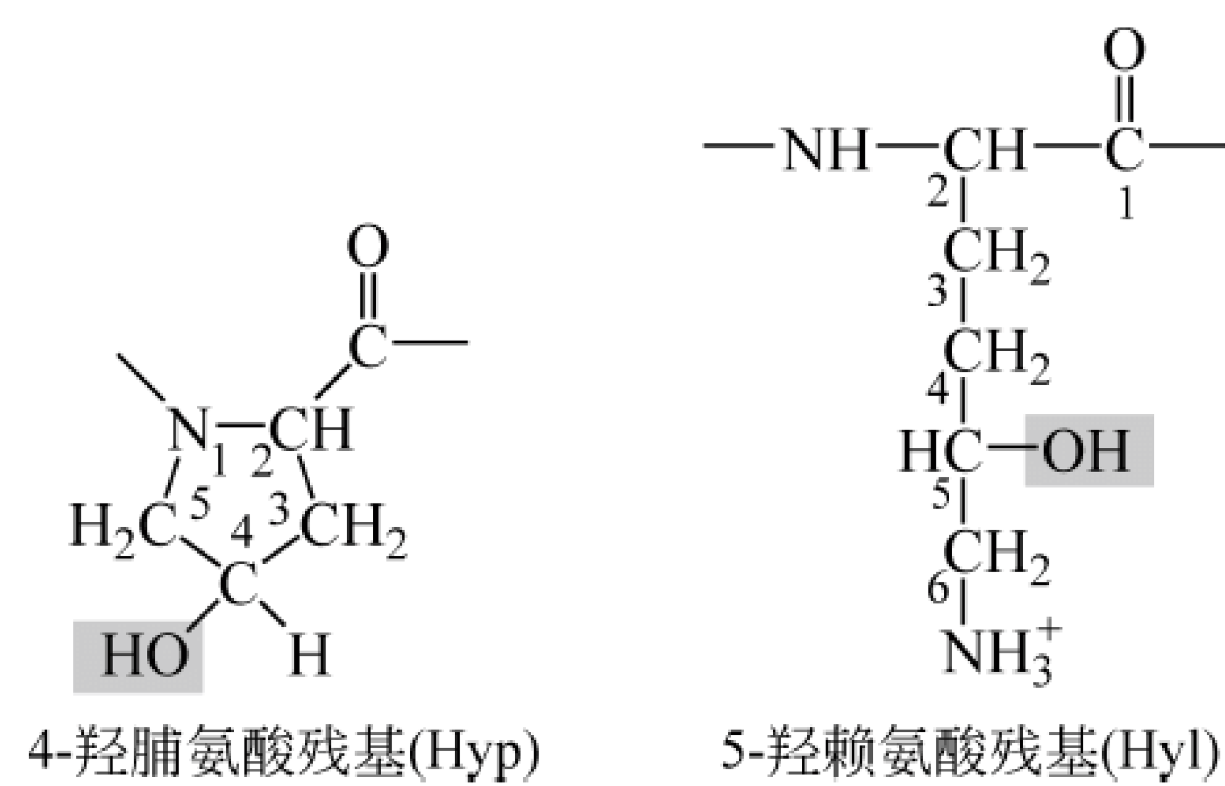


图 3.14 4-羟脯氨酸残基和 5-羟赖氨酸残基结构

三螺旋中每条肽链每隔 3 个残基就穿过三螺旋中心一次，中心空隙太小，只有侧链仅为 H 的 Gly 能够进入中心位置，所以沿着三螺旋中心轴方向堆积的都是来自 3 条链的 Gly，而 Gly 两侧的 *X* 和 *Y* 只能位于螺旋外侧了。出现这种现象是由于具有同样 Gly-*X*-*Y* 重复序列的 3 条肽链彼此错开一个残基导致的。这样一来，分别来自 3 条肽链的 Gly、*X* 和 *Y* 就出现在沿三螺旋中心轴的每一个平面。平面中每一 Gly 的酰胺氢原子都能与相邻链上 *X* 残

基的羰基氧原子之间形成氢键，结果使三螺旋更稳定。

稳定胶原的力除了氢键以外，还有发生在原胶原分子间和原胶原分子内链间的共价交联，使得胶原的稳定性和强度进一步增强。首先在赖氨酰氧化酶(依赖铜)催化下，生成ε-醛基赖氨酸。ε-醛基赖氨酸残基(和它们的羟化衍生物)与赖氨酸(和5-羟赖氨酸)残基反应在原胶原分子间形成Schiff碱。两个ε-醛基赖氨酸残基缩合形成原胶原分子内链间羟醛交联(图3.15)。

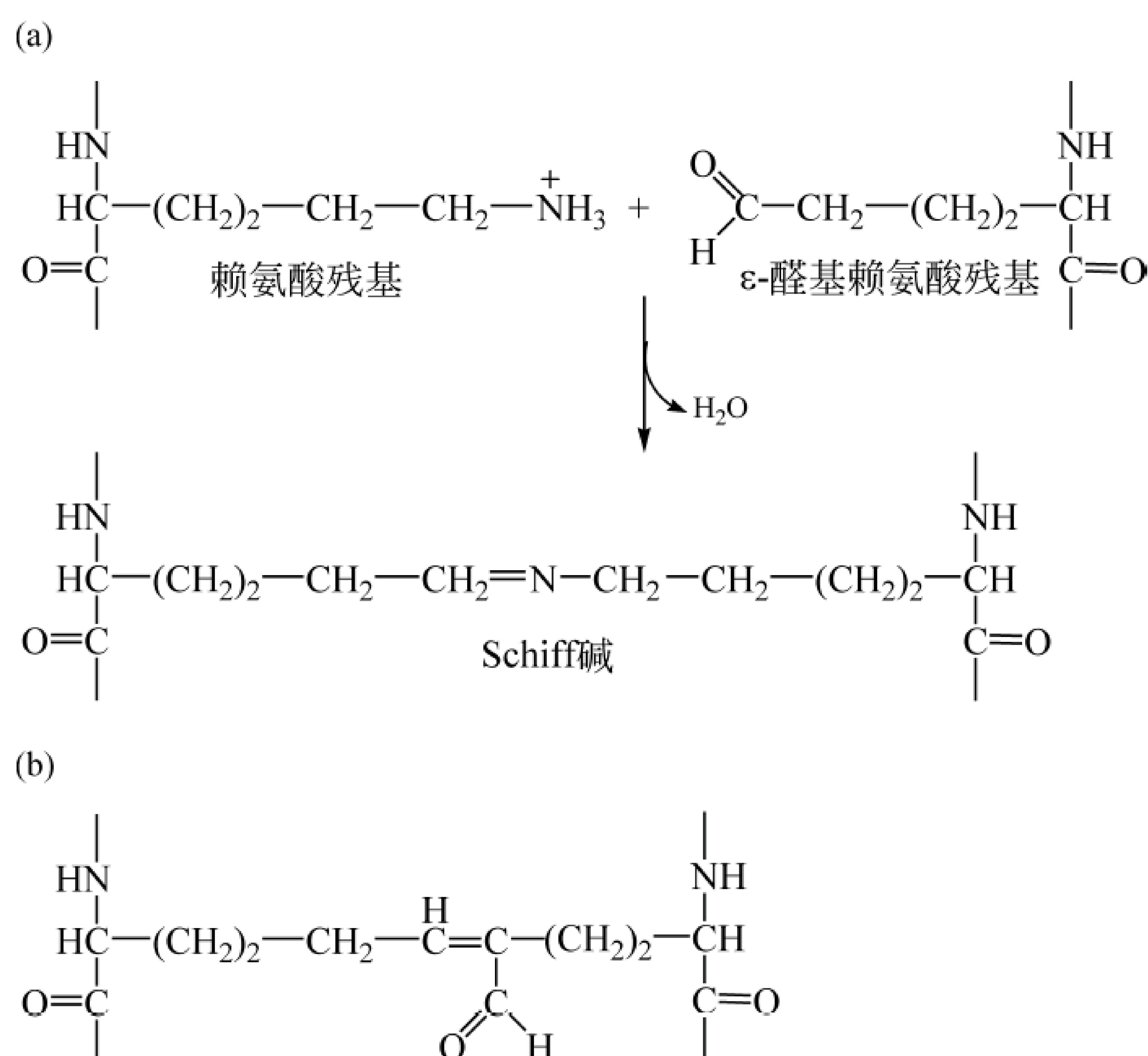


图3.15　胶原内的共价交联

(a) ε-醛基赖氨酸残基与赖氨酸残基缩合形成原胶原分子间Schiff碱交联；
(b) 两个ε-醛基赖氨酸残基缩合形成原胶原分子内链间羟醛交联

3.2　三级结构

蛋白质的三级结构指的是单一一条某些局部已经具有了α-螺旋和(或)β-折叠片的多肽链折叠成一个紧密堆积的，并指明了蛋白质中各个原子位置的三维结构。已知的蛋白质结构大都是由X射线晶体学、核磁共振和单颗粒冷冻电镜研究获得的。三级结构的一个重要特征是一级结构上离得很远的氨基酸残基被拉到了一起，而且它们的侧链之间可进行相互作用。二级结构的稳定依靠的是多肽链骨架的酰胺氢和羰基氧之间形成的氢键，而三级结构的稳定基本上靠的是氨基酸残基侧链之间的非共价相互作用，此外某些蛋白质中的共价二硫键对稳定三维构象也起着重要的作用。

3.2.1　超二级结构

超二级结构(supersecondary structures)或称基序(motif)是α-螺旋和(或)β-折叠片的一些特定组合——三级结构的结构元件(图3.16)。

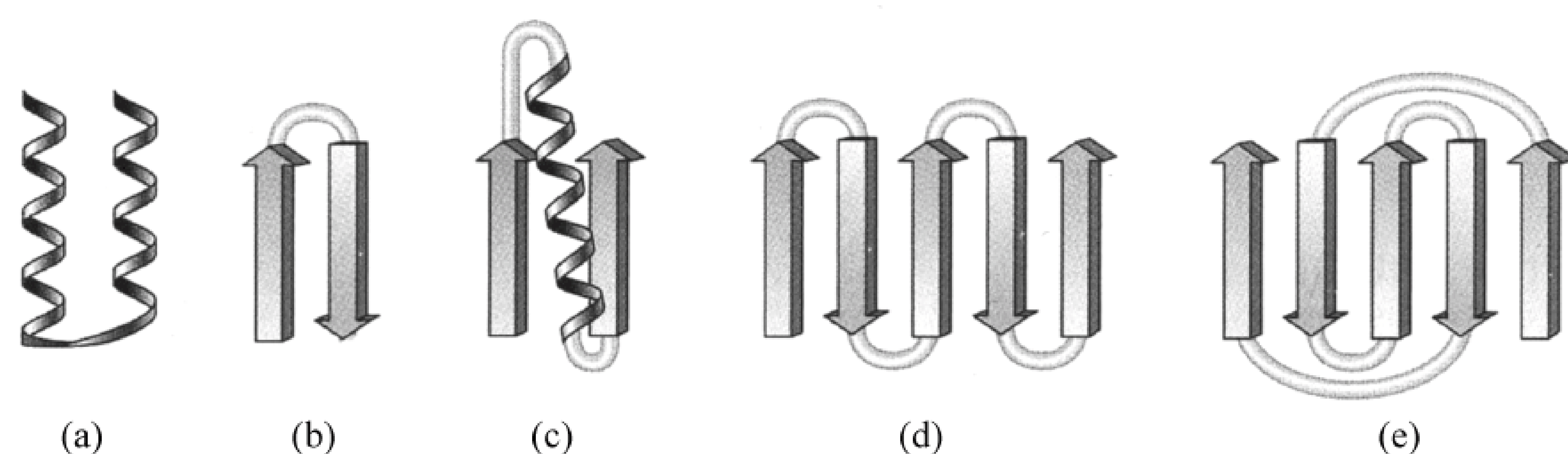


图 3.16　几种常见的超二级结构

(a) αα；(b) β-发卡；(c) βαβ；(d) β-回曲；(e) 希腊钥匙

图 3.16 中(a)αα 是由一个环连接的两个反平行 α-螺旋构成的螺旋-环-螺旋结构；(b)β-发卡是由两个相邻的反平行 β-链通过发夹环连接形成的；(c)βαβ 结构单元是最常见的基序，由两个平行 β-链通过两个环与一个插入的 α-螺旋连接组成；(d)β-回曲(meander)是一个由环或转角依次连接 β-链组成的反平行 β-折叠片；(e)希腊钥匙(Greek key)(名字来自古希腊陶器上的图形)连接有 4 个或更多的反平行 β-链。

3.2.2　结构域

结构域(domain)是在二级结构单元或超二级结构单元基础上形成的三级结构内的局部折叠区，呈紧密球状体，都具有特定功能。例如可以结合小分子，催化一个反应等，所以有时结构域也称为功能域，大多数结构域是由连续的 40～200 个氨基酸残基组成的。许多蛋白质都是由数个结构域构成的，但有的蛋白质就是由一个结构域组成的。结构域之间通常是通过环连接，但也可以通过每个结构域表面的氨基酸侧链形成的弱的相互作用彼此结合。

根据所含二级结构单元种类、比例和组合方式，结构域分为 5 种常见的类型：α-螺旋束、双扭平行 β-折叠、β-桶、α/β 桶和 β-螺旋。图 3.17 给出了含有这些类型结构域的 5 种蛋白质的三级结构。

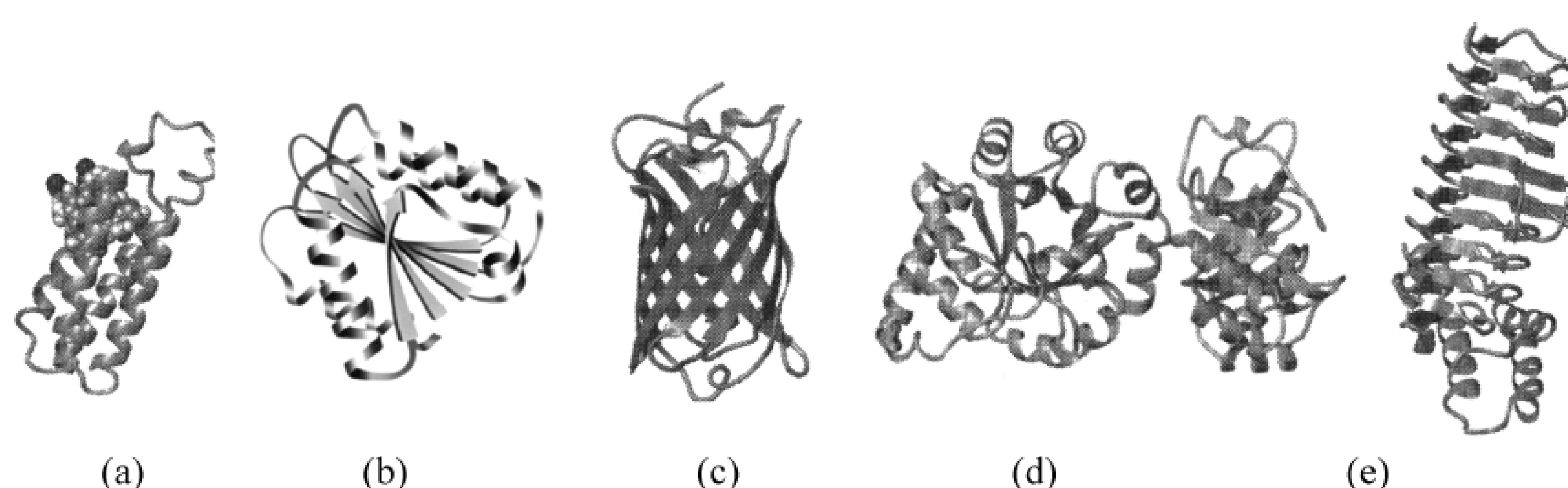


图 3.17　5 种蛋白质的三级结构

(a) *E. coli* 细胞色素 b_{562}(α-螺旋束)；(b) 黄素氧还蛋白(双扭型平行 β 折叠)；(c) 水母绿色荧光蛋白(β-桶)；(d) *E. coli* 色氨酸生物合成酶(两个 α/β-桶)；(e) *E. coli* UDP-N-乙酰葡糖胺酰基转移酶(β-螺旋)

3.3　四级结构

四级结构指的是具有多个亚基(subunit)的蛋白质中亚基在三维空间的组织和排列，每个亚基都是一个独立的多肽链。亚基在寡聚蛋白中的排列一般都具有确定的几何结构，而

且表现出对称性。亚基可以是相同的,也可以是不同的。亚基相同的寡聚蛋白常见的是二聚体和四聚体,而不同亚基组成的寡聚蛋白,每种亚基的功能也都不一样。

寡聚蛋白的亚基通常都是通过弱的非共价相互作用结合在一起的,例如疏水相互作用和静电力,疏水相互作用是主要的力。由于亚基之间的力比较弱,通常在实验室可人为地将寡聚蛋白的亚基分开,然而在体内亚基通常维持着紧密联系。图 3.18 给出了几种多亚基蛋白质的三维结构飘带模式图。

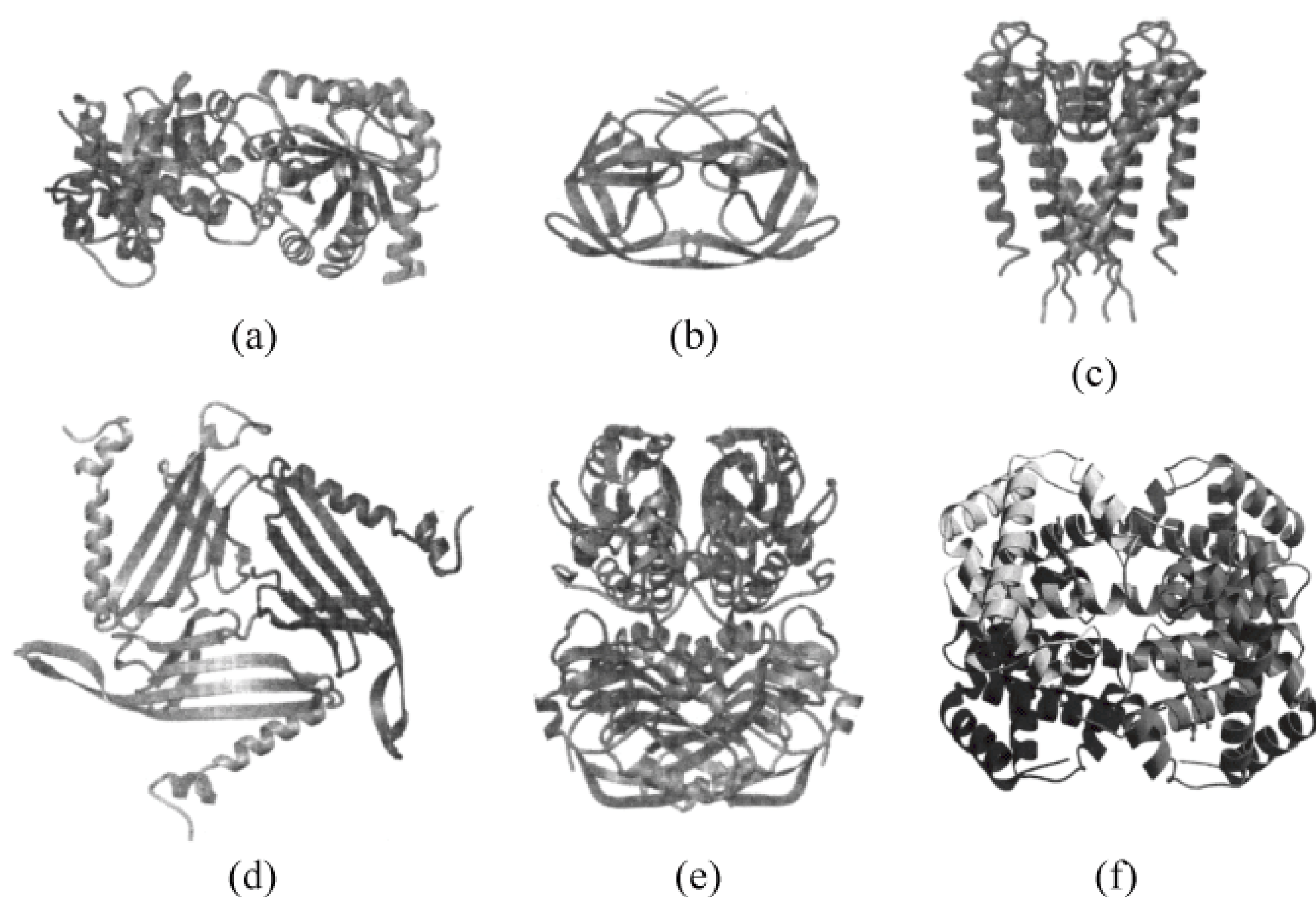


图 3.18　几种寡聚蛋白质的四级结构

(a) 鸡丙糖磷酸异构酶(二聚体);(b) HIV-1 天冬氨酸蛋白酶(二聚体);(c) 链霉素钾通道蛋白(四聚体);(d) 噬菌体 MS2 衣壳蛋白质(三聚体);(e) 人次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(两种亚基组成的四聚体);(f) 人血红蛋白(两对 α/β 亚基组成的四聚体)

确定一个寡聚蛋白的亚基组成,通常都是通过凝胶过滤层析测定蛋白质的相对分子质量,然后再通过 SDS-PAGE 确定每个亚基的相对分子质量。

3.4　蛋白质变性与复性

在蛋白质合成一章中将会了解到一个蛋白质合成开始于核糖体上一条多肽链的合成,肽链经折叠,最后形成稳定的具有生物学功能的惟一天然构象。本节将从维持稳定蛋白质结构的作用力开始,通过一个蛋白质的变性和复性的实际例子,简单讨论蛋白质的折叠过程。

3.4.1　稳定蛋白质结构的作用力

二级结构是靠肽链骨架中的酰胺与羰基之间形成的氢键维持稳定的,而稳定蛋白质结构的作用力除了共价键二硫键外,主要依赖于大量的非共价键:疏水作用、氢键、范德华力相互作用和离子相互作用。

1. 疏水作用

在水相介质中,球蛋白中的疏水基团彼此靠近、聚集以避开水的现象称为疏水作用(hydrophobic interaction)或疏水效应(hydrophobic effect),疏水作用是稳定蛋白质三维结

构的主要作用力。

前面提到球蛋白典型特征是具有一个疏水的内部环境和一个亲水的表面,哪些氨基酸残基倾向聚集于内部,哪些残基会出现在表面则要看它们的疏水度(表3.1)。疏水度(hydropathy)是蛋白质中氨基酸残基侧链的疏水趋向,侧链疏水度越大,越容易聚集于蛋白质内部,而分布于蛋白质表面的通常都是那些疏水度小的氨基酸。

表3.1 氨基酸侧链的疏水度

氨基酸侧链	疏水度	氨基酸侧链	疏水度
Ile	4.5	Trp	−0.9
Val	4.2	Tyr	−1.3
Leu	3.8	Pro	−1.6
Phe	2.8	His	−3.2
Cys	2.5	Glu	−3.5
Met	1.9	Gln	−3.5
Ala	1.8	Asp	−3.5
Gly	−0.4	Asn	−3.5
Thr	−0.7	Lys	−3.9
Ser	−0.8	Arg	−4.5

(来源:Kyte. J. ,Doolittle. R. E,1982)

从表3.1中可看到,疏水度大的侧链是Ile、Val、Leu和Phe等残基侧链,这些氨基酸通常都聚集于蛋白质内部形成疏水环境,而酸性和碱性氨基酸侧链疏水度都很小,通常出现在蛋白质表面。

2. 氢键

氢键是稳定α-螺旋和β-折叠等蛋白质二级结构的作用力,除此之外,在最终形成的结构中也还含有其他类型的一些氢键,如多肽链骨架和水之间、多肽链骨架和极性侧链之间,两个极性侧链之间、极性侧链和水之间形成的氢键,大多数氢键都是N—H---O类型(图3.19)。

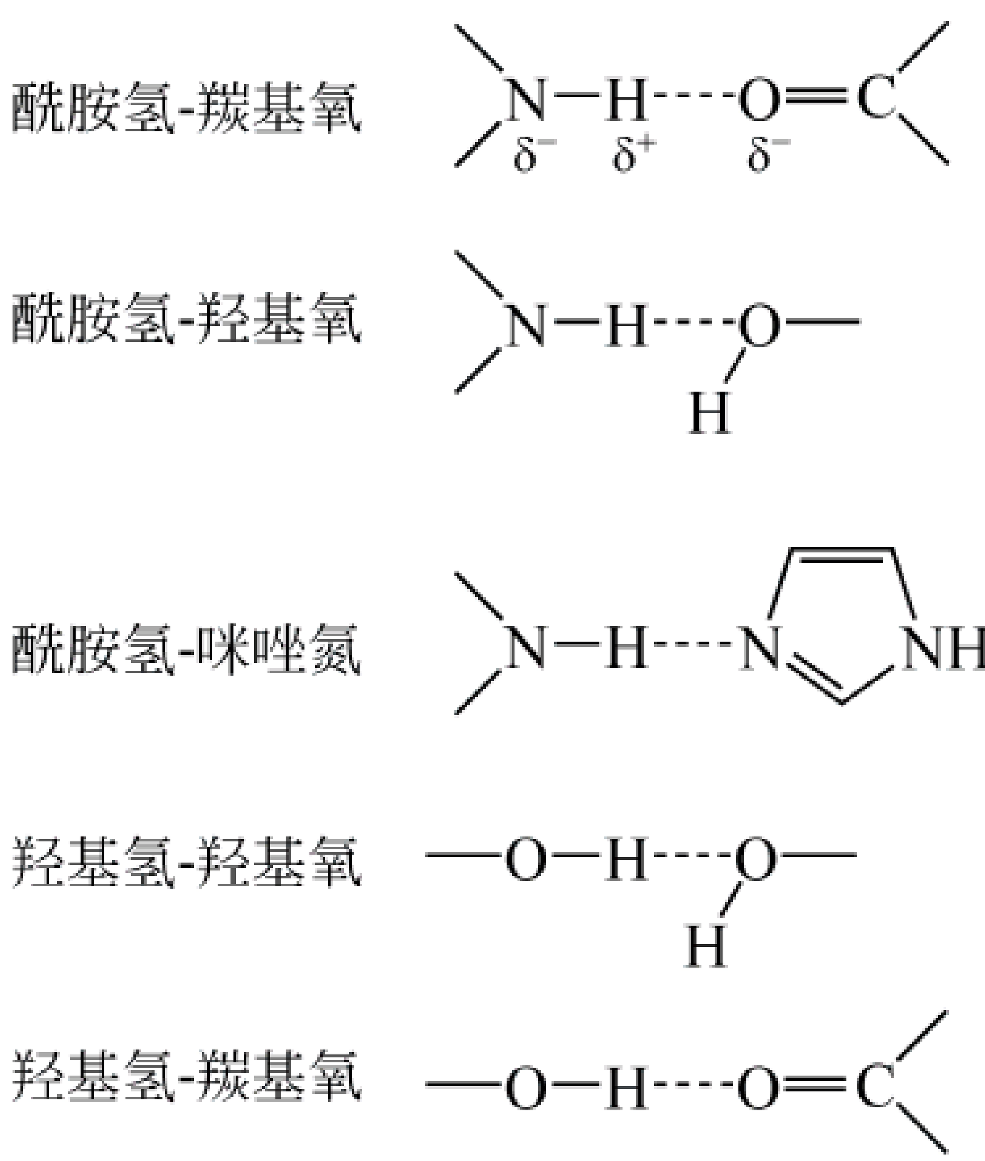


图3.19 蛋白质中的几种氢键类型

3. 范德华力

这里提到的范德华力指的是非极性残基侧链或基团之间的作用力,包括吸引力和斥力两种相互作用。其中的范德华吸引力只有当两个非键合原子或分子处于一定距离时才能达到最大,这个距离称为接触距离或范德华距离,等于两个原子的范德华半径之和。但当两个原子或分子靠得太近时,将产生斥力。虽然范德华力相对来说比较弱,但由于范德华力相互作用数量大,并且具有加和性,因此范德华力对球蛋白的稳定性也有贡献。

4. 静电作用

静电作用是带有相反电荷的侧链或基团之间的离子相互作用,也称为盐桥或离子键。虽然这种作用很弱,但也是稳定蛋白质的一种作用力。由于离子化的侧链一般都出现在球

蛋白的表面,所以对整个球蛋白的稳定性的贡献是最小的。

5. 二硫键

在氨基酸分类中提到两个半胱氨酸可以形成二硫键,蛋白质中的两个半胱氨酸残基被氧化后同样可形成二硫键。有些蛋白质在形成天然构象时,多肽链内和链间就已经形成了二硫键。一旦二硫键被还原变成—SH,将破坏蛋白质天然构象,导致生物活性丧失。所以,二硫键存在使得蛋白质对去折叠以及降解不那么敏感,起着稳定蛋白质的作用。

3.4.2　蛋白质变性与复性

环境变化或化学处理都会引起蛋白质天然构象破坏,导致生物活性降低或完全丧失,这一现象称为蛋白质变性(protein denaturation)。通常讲的变性不破坏共价键,只是破坏二级结构、三级结构和四级结构。

改变 pH 会影响到蛋白质中可解离侧链的离子状态,使氢键断裂,或是制造电荷排斥区和破坏离子对,使得蛋白质变性。加热可引起振动和旋转能量的增加,也会破坏蛋白质天然构象中的弱相互作用。高温或是强酸或强碱条件下,除了会破坏非共价键的相互作用外,还会由于共价键的破坏引起蛋白质不可逆的失活。

另外,一些化学试剂,例如称为离液剂(chaotropic agent)的脲、盐酸胍及十二烷基硫酸钠等去污剂也是常用的蛋白质变性试剂,其主要作用是破坏疏水作用,增加非极性物质在水中的溶解度。这些试剂的影响有时是可逆的,使用这些变性剂可以洞察蛋白质的折叠状况(图 3.20)。

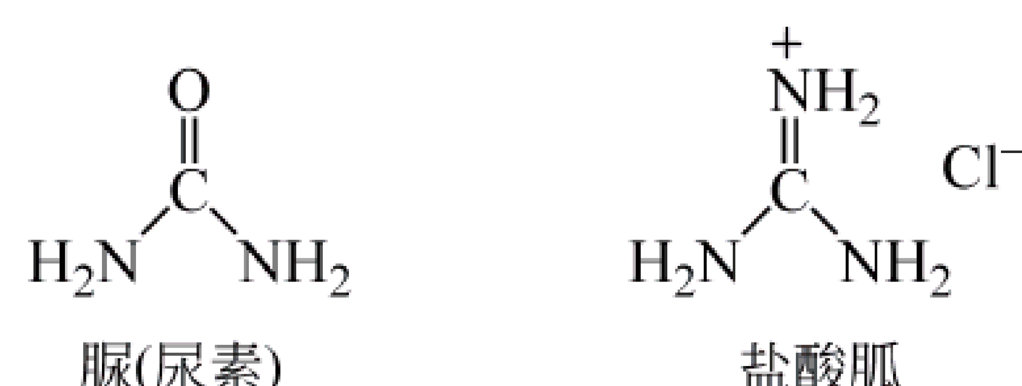


图 3.20　脲和盐酸胍

含有二硫键的蛋白质要实现彻底变性除了要破坏疏水作用之外,还需要切断二硫键,所以常在变性介质中加入巯基乙醇或二硫苏糖醇等巯基试剂。

变性的蛋白质在一定条件下也可以复性(renaturation),这一现象是 1957 年 Christian Anfinsen 等通过核糖核酸酶 A(ribonuclease,RNase A)实验证明的。天然的 RNase A 是一条由 124 个氨基酸残基组成的单链蛋白质,含 4 个二硫键,天然构象含有 α-螺旋、β-折叠及由它们构成的结构域(图 3.21)。

RNase A 在含有 2-巯基乙醇的 8mol/L 脲溶液中折叠完全被打开,4 个二硫键断裂被还原为 8 个游离的—SH,酶的三级结构和催化活性完全丧失。通过对变性溶液透析除去脲和巯基乙醇,还原的 RNase A 自然重折叠回天然结构。重折叠的 RNase A 在空气中氧化后恢复了天然的二硫键和充分的酶活性。

如果脲变性的 RNase A 首先氧化,然后除去脲,结果会生成带有随机形成的二硫键的蛋白分子混合物。该混合物的活性只是天然酶活性的 1%。来自 8 个 Cys 随机配对形成 4 个二硫键其总几率可能有 105 种不同的组合,而其中仅有 1%(1/105≈1%)为天然的二硫键。

Anfinsen 等的工作表明变性的蛋白质在一定条件下能够自发折叠、恢复成它的天然构象,意味着折叠的信息存在于蛋白质的一级结构中,可以说一级结构决定了它的三维结构。那么蛋白质又是怎样折叠成其天然构象的呢?

图3.22给出了一个假设的多肽链折叠途径。在开始折叠时,由于疏水效应多肽链自身折拢(疏水折拢:hydrophobic collapse),开始形成局部的α-螺旋和β-折叠等二级结构,这个中间体称为熔球(molten globule)。熔球是拥有天然蛋白质大部分二级结构,但几乎还不具有三级结构的中间体。然后肽链骨架重排,形成有代表性的基序,并开始形成三级结构,直至最后稳定的天然构象。

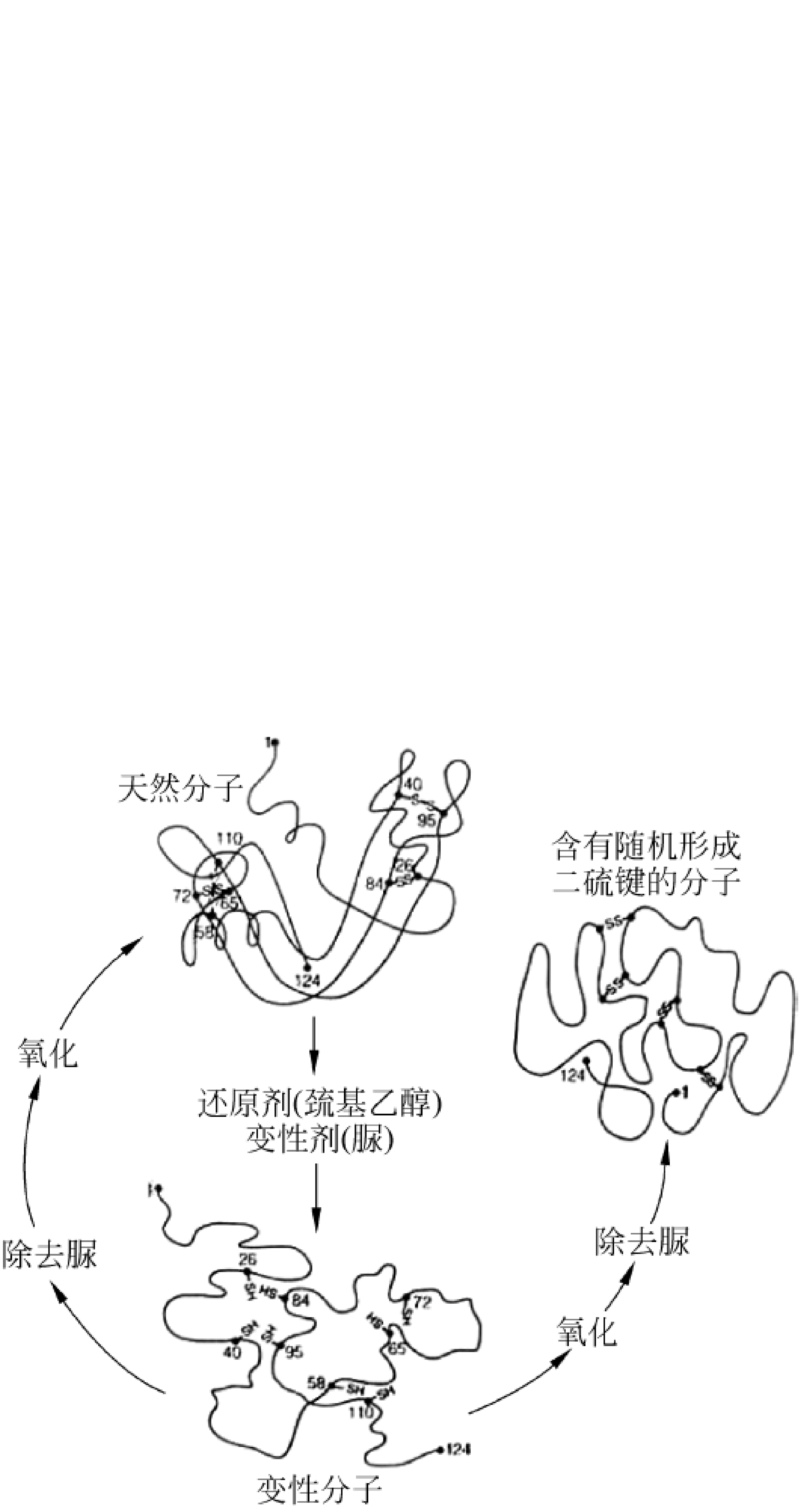


图3.21 RNase A的变性和复性

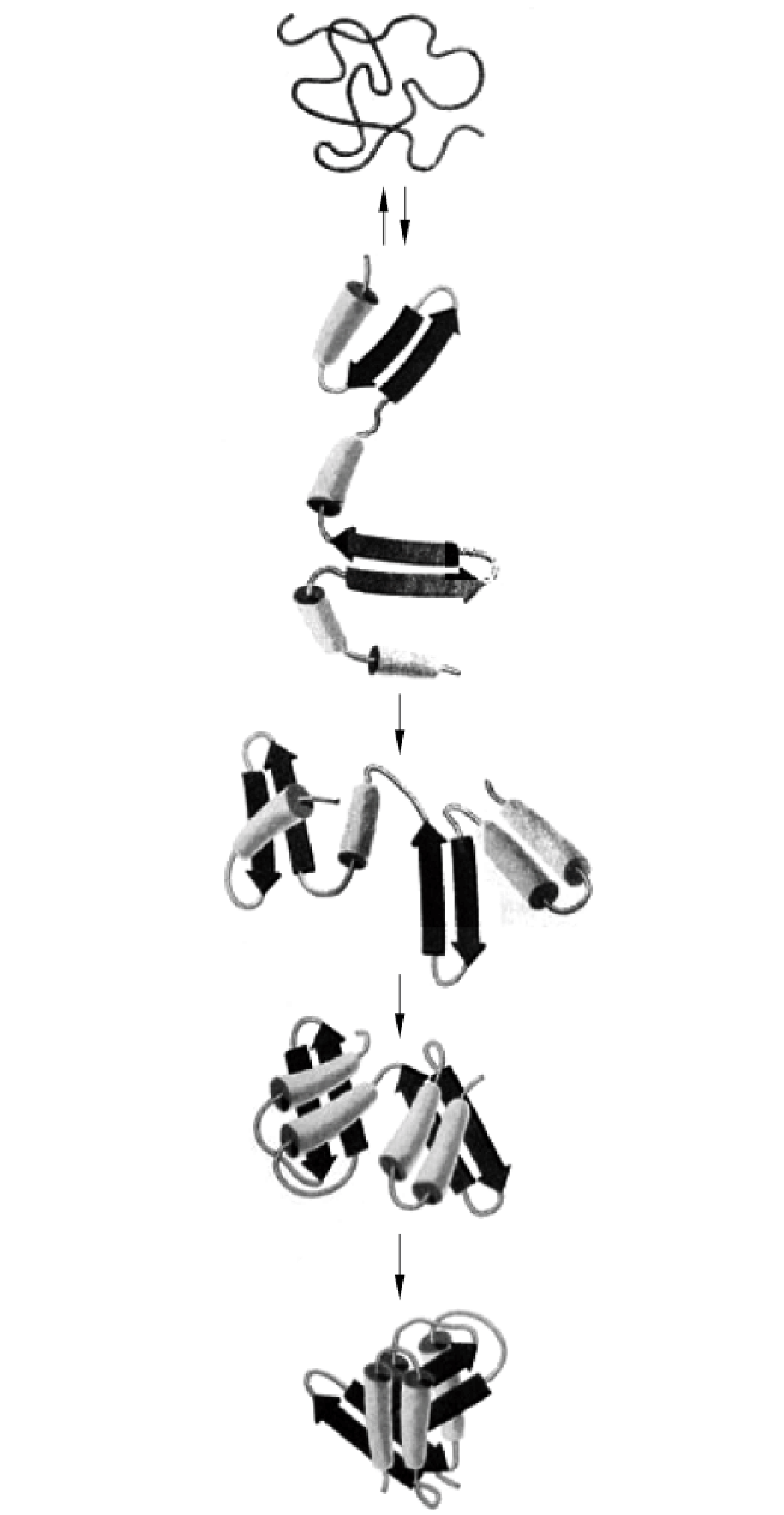


图3.22 假设的蛋白质(有两个结构域)折叠途径

[引自Goldberg. M. E.,Trends Biochem. Sci.,1985,10:389]

然而并不是所有的蛋白质都可自发进行折叠的,有些蛋白质还需要其他一些伴侣蛋白(chaperone)协助才能进行正确折叠。研究表明伴侣蛋白通常是结合去折叠和部分折叠的肽链,防止疏水片段聚集导致非天然折叠和沉淀,防止不正确的折叠中间产物的形成,加快正确折叠的进行和提供折叠所需要的微环境。

现在研究得比较透彻的伴侣蛋白是热休克蛋白(heat shock protein,Hsp),这样称呼是由于热休克蛋白在温度升高时可快速合成。典型的伴侣蛋白是Hsp70(相对分子质量约为

70 000)，Hsp70 的作用可能是与新生肽链结合，防止肽链过早折叠。另一类称为陪伴蛋白(chaperonin)(在 *E. coli* 中也称为 GroE)，与伴侣蛋白同属于分子伴侣家族。例如 Hsp60，也是一种热休克蛋白。有关伴侣蛋白的作用机制将在第 11 章蛋白质合成中描述。

相关话题 疯牛病

蛋白质错误折叠会导致疾病的发生，例如一种名为朊蛋白，也称为朊病毒(Prion)的小蛋白质(28KD)由于变性，结构发生了变化，非正常折叠的朊蛋白(异常朊蛋白)变成了牛海绵状脑病，俗称疯牛病(Mad Cow Disease)或羊瘙痒病(Scrapie)和人类海绵状脑病克-雅病(Creutzfeldt-Jacob disease)的致病介质，可能谁也没有想到疯牛病居然是由于蛋白质变性引起的。

朊蛋白是在神经组织的细胞膜上发现的一种糖蛋白，但其功能还不清楚。当朊蛋白变性时，含有大量 α-螺旋的正常构象变成含有更多 β-折叠片的非正常构象(图 3.23)，就会导致牛海绵状脑病的发生。有一种假设认为错误折叠的朊蛋白可与正常朊蛋白结合，使正常朊蛋白重新折叠，变成异常朊蛋白，而错误折叠的分子会诱发更多的错误折叠。

科学家研究初步认为牛吃了含有已发生牛海绵状脑病的牲畜肉末的饲料，摄入的异常朊蛋白利用免疫系统的巨噬细胞在体内运输并最终到达神经组织，然后一直传播到达脑部，具有 β-折叠和 α-螺旋结构的异常朊蛋白又引起脑组织中的正常朊蛋白变性，形成损坏脑细胞的不溶性纤维聚集凝块，而导致牛海绵状脑病。如果人吃了牛海绵状脑病发作的牛肉，有可能引发人海绵状脑病。

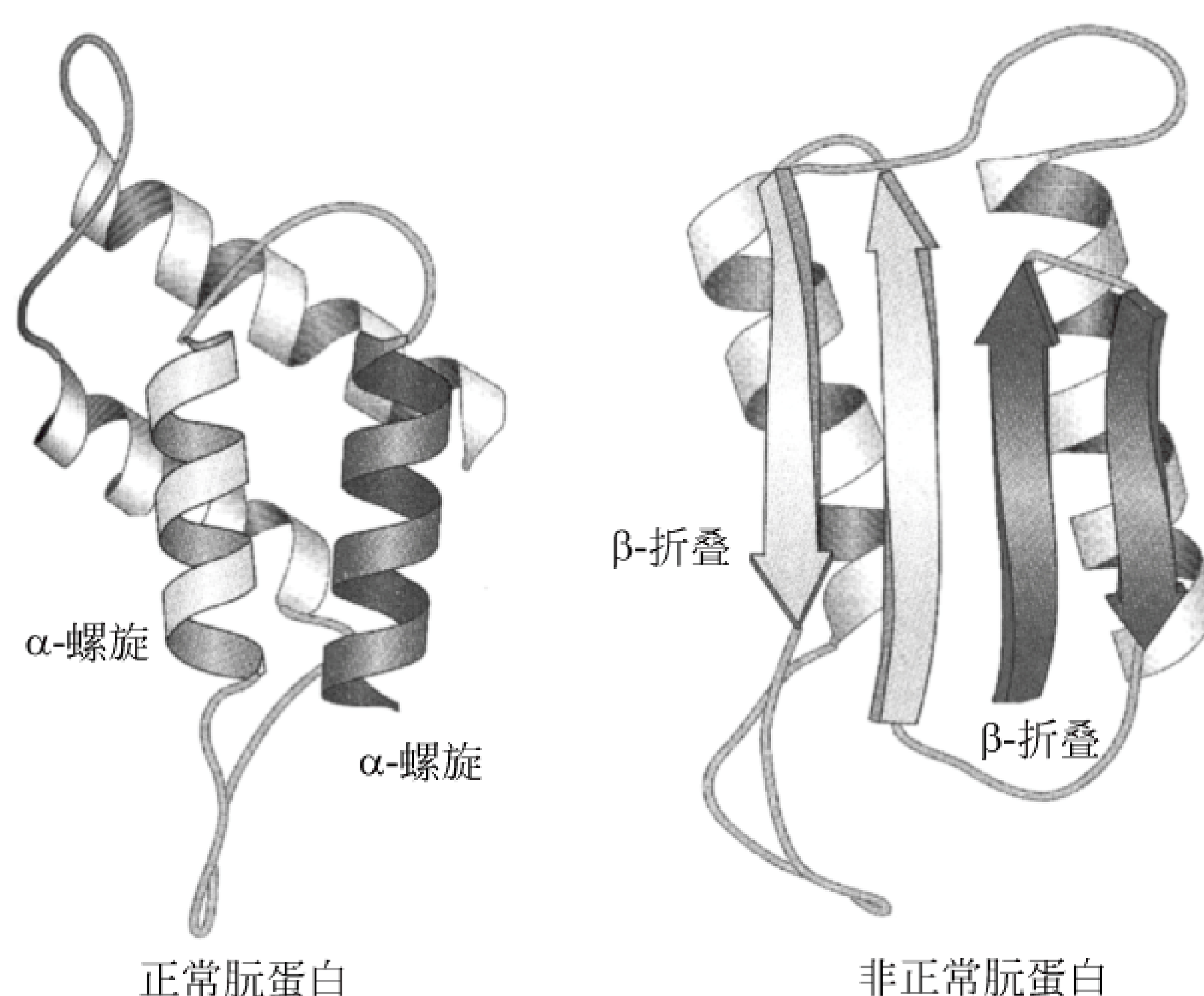


图 3.23 朊蛋白结构

(来源：Prusiner S. B.，1996)

3.5 肌红蛋白和血红蛋白

肌红蛋白(myoglobin,Mb)和血红蛋白(hemoglobin,Hb)是蛋白质中结构首先被阐明的蛋白质。剑桥大学cavendish实验室的John Kendrew于1957年首次用X射线晶体分析法测定了单一肽链的肌红蛋白的三级结构,而同一个实验室的Max Peutz等于1959年第一个阐明了由4条肽链组成的寡聚蛋白马血红蛋白的三维结构,为此二人共同获得了1962年诺贝尔化学奖。

3.5.1 肌红蛋白和血红蛋白的结构

肌红蛋白是脊椎动物肌肉中的一个胞内蛋白质,储存氧气,并向频繁收缩的肌肉供给氧气。氧合血红蛋白释放的氧通过质膜扩散到肌肉细胞,又与肌红蛋白结合,然后氧合肌红蛋白扩散到线粒体,氧释放出来,产生的脱氧肌红蛋白再扩散回质膜。在氧供给充分情况下,大部分肌红蛋白都处于氧合状态。

John Kendrew测定了来自抹香鲸肌红蛋白的晶体结构,这是一个由153个氨基酸残基组成的单体蛋白质,由命名为A～H的8个α-螺旋组成。肌红蛋白中含有一个血红素辅基,位于肌红蛋白的E、F螺旋之间的疏水裂隙,一分子肌红蛋白结合一个O_2(图3.24)。

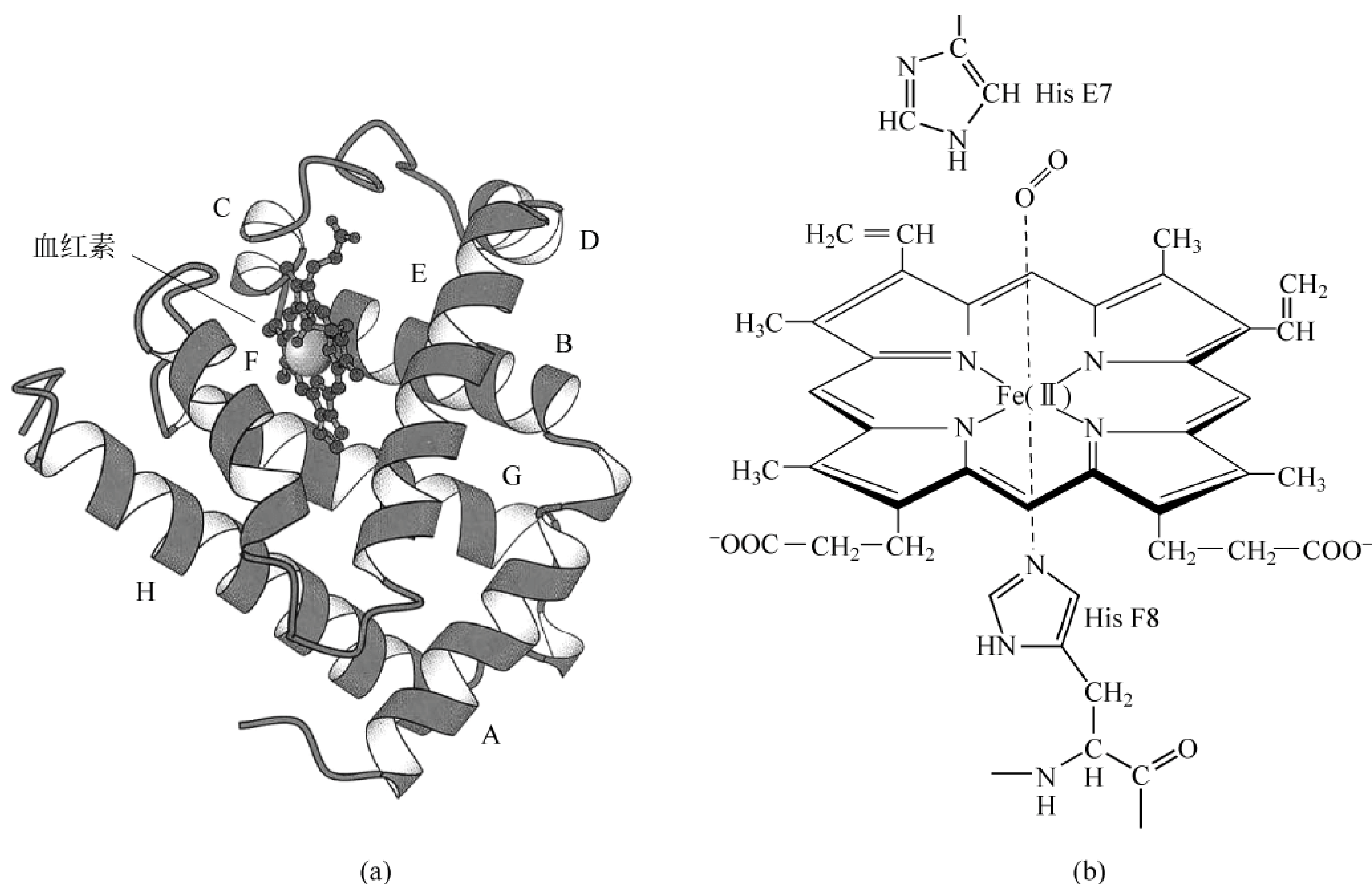


图3.24 抹香鲸肌红蛋白结构

(a)抹香鲸肌红蛋白结构飘带模式图;(b)肌红蛋白和血红蛋白中的血红素结构,Fe(Ⅱ)与卟啉环平面的4个N原子相连,第5个配体是His F8,另外还与第6个配体O_2(有氧时)或His E7(无氧时)结合

血红素由一个复杂的原卟啉Ⅸ(protoporphyrin Ⅸ)有机环共轭系统组成。卟啉环的Fe(Ⅱ)与卟啉环的4个N原子相连,卟啉环下面的His F8(螺旋F的第8位残基)是

Fe(Ⅱ)的第5个配体。不结合氧时，His E7(螺旋E的第7位残基)作为第6个配体与Fe(Ⅱ)结合。当有O_2存在时，O_2取代His E7与Fe(Ⅱ)结合。

哺乳动物血红蛋白是一个由两个α亚基和两个β亚基组成的四聚体寡聚蛋白质，表示为$\alpha_2\beta_2$(αβ二聚体)。每个亚基都含有一个像肌红蛋白那样的血红素辅基，所以一分子血红蛋白可结合4个O_2。无论是α亚基还是β亚基，它们的三级结构与肌红蛋白极为相似，也沿用肌红蛋白中α-螺旋的A～H命名(图3.25)。

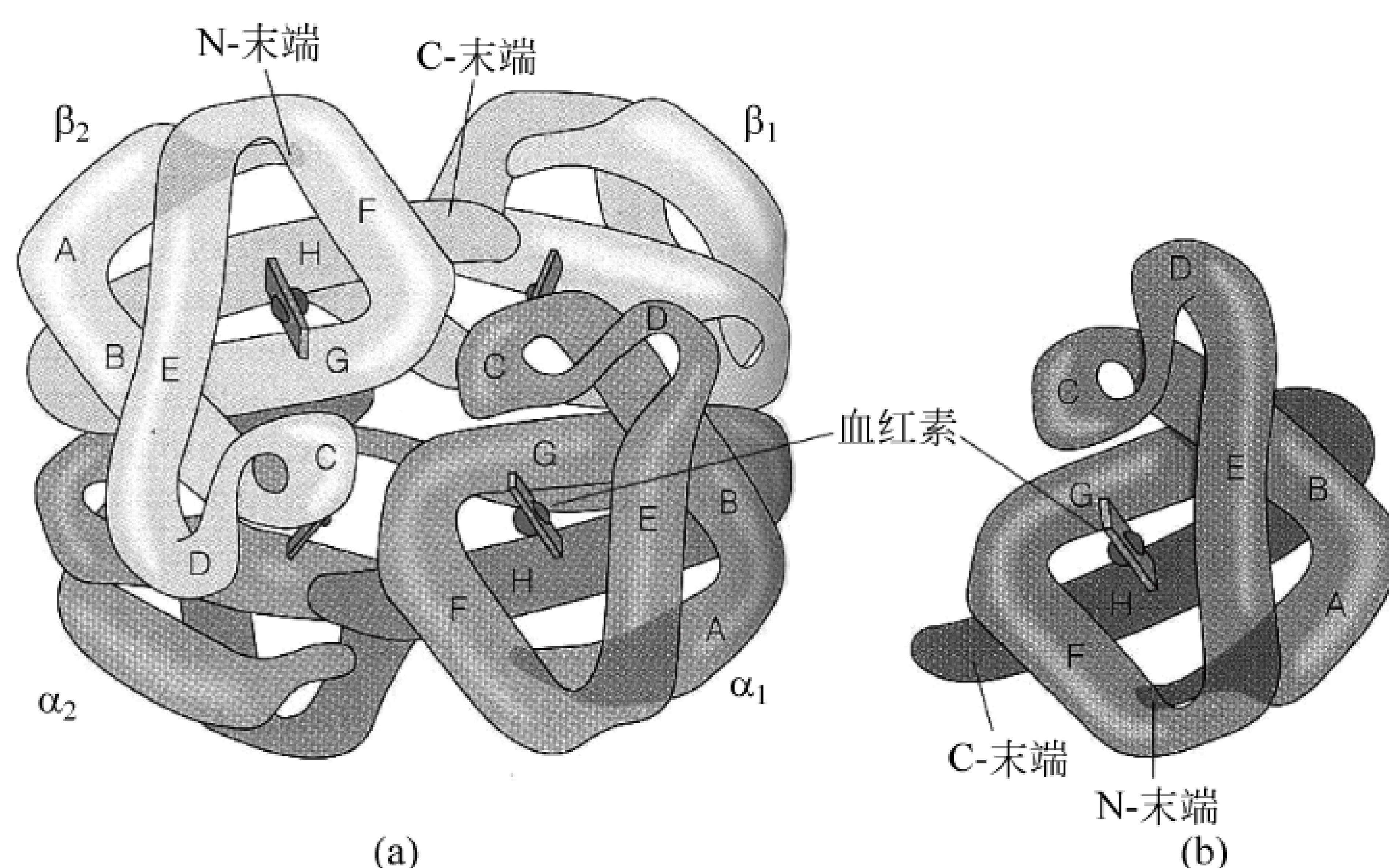


图3.25　血红蛋白与肌红蛋白结构比较

(a) 血红蛋白；(b) 肌红蛋白

3.5.2　血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线

平衡状态下血红蛋白和肌红蛋白结合氧的程度取决于蛋白浓度和氧浓度，这一关系可以通过氧结合曲线(氧合曲线)来描述。如果以固定量的肌红蛋白或血红蛋白的饱和份数(氧饱和度，Y)对氧浓度(以氧分压pO_2表示)作图，就可得到血红蛋白或肌红蛋白的氧合曲线(图3.26)。以肌红蛋白(Mb)为例，氧合肌红蛋白表示为MbO_2，那么平衡时氧饱和度(Y)可表示为：

$$Y = [MbO_2]/([MbO_2]+[Mb])$$

肌红蛋白氧合曲线是双曲线形，一分子肌红蛋白只能结合一分子O_2。四聚体的血红蛋白氧合曲线为S形，由于每个血红素可结合一个O_2，所以血红蛋白可结合$4O_2$。S形曲线是由于在结合氧时血红蛋白结合氧部位相互作用的结果，一个O_2与一个血红素的结合使得血红蛋白的氧亲和力增加，结合其他O_2更容易。这一相互作用的结合现象称为结合的正协同性(positive cooperativity)。

正协同性实际上反映了结合氧时血红蛋白构象发生的变化。脱氧血红蛋白是靠几个亚基内和亚基之间的离子对稳定的，此时结合着His F8的Fe(Ⅱ)与His E7结合，Fe(Ⅱ)突出于卟啉环平面外。当第一个O_2取代E7与一个亚基的Fe(Ⅱ)结合时，O_2将Fe(Ⅱ)拉回到卟啉环平面，导致含His 8的F螺旋倾斜和移动，破坏了稳定脱氧血红蛋白的离子对(图3.27)。三级结构的变化使得原来处于低亲和性的脱氧血红蛋白构象(tense，T态)转换为高亲和性的氧合血红蛋白构象(relaxed，R态)，结果使得其余的亚基更容易结合O_2。

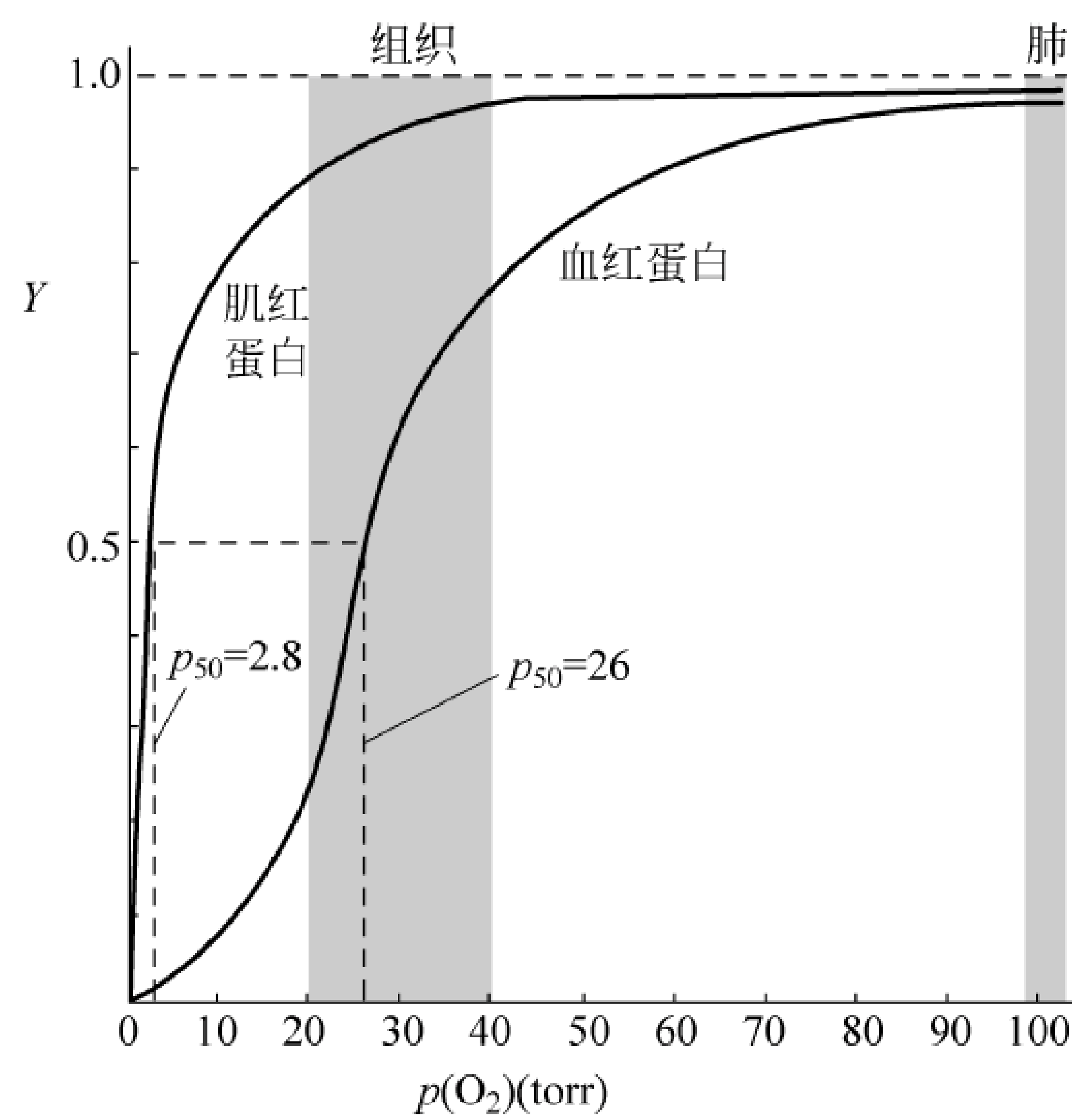


图 3.26　肌红蛋白和血红蛋白氧合曲线

肌红蛋白的 p_{50} 为 2.8torr,血红蛋白的 p_{50} 为 26torr (1torr＝133.3Pa)

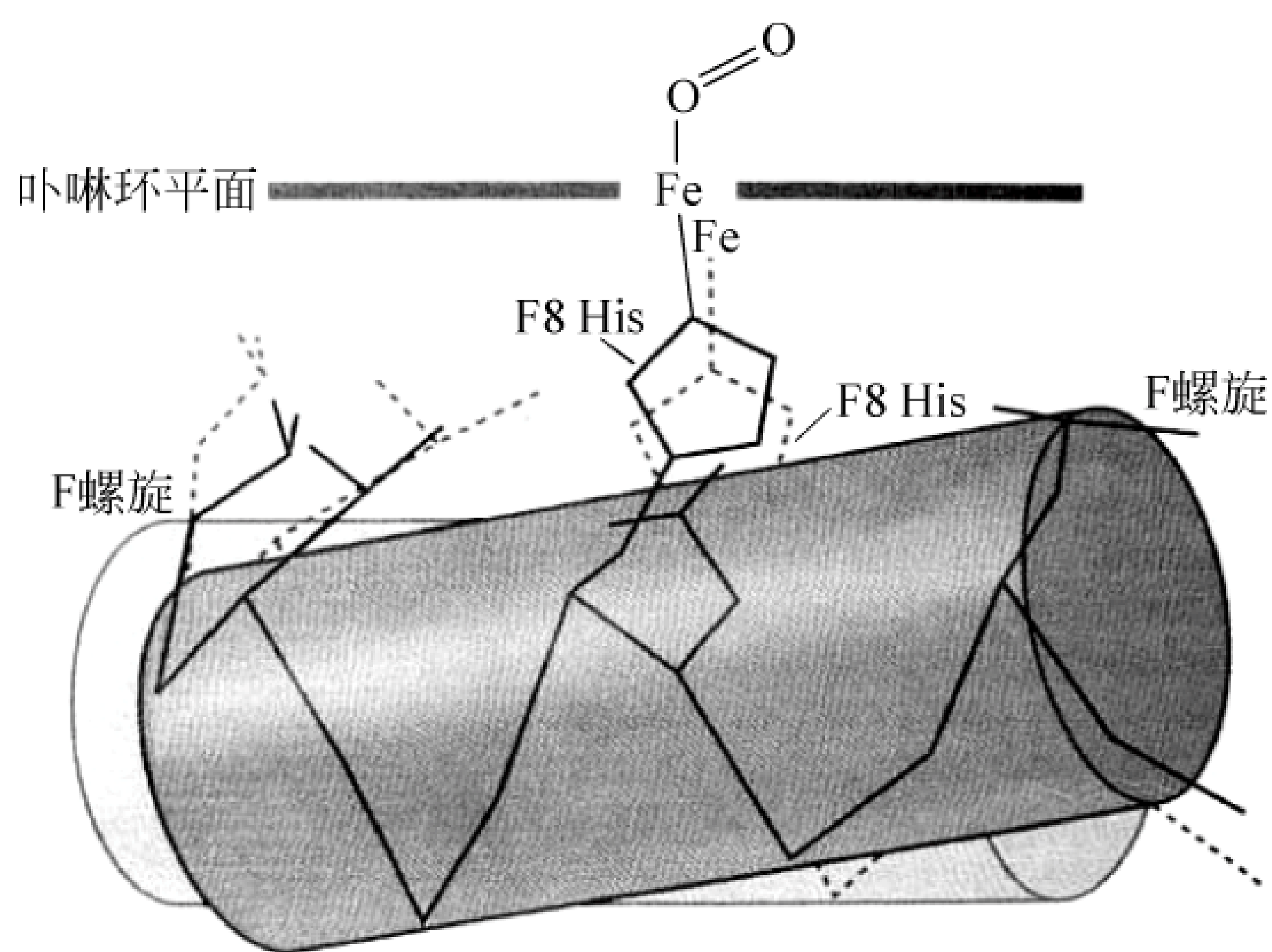


图 3.27　氧合诱导血红蛋白构象变化

深色、实线部分为 O_2 与 Fe 结合,将结合着 His F8 的 Fe 拉回卟啉环平面,使得含该 His 的 F 螺旋移到了位置。虚线、浅色图为脱氧血红蛋白亚基状态

蛋白质对 O_2 亲和力可通过半饱和下的氧分压(p_{50})来衡量。显然 p_{50} 低表明蛋白对氧的亲和力高,p_{50} 高表明亲和力低。当 pO_2 为 2.8torr(1 大气压＝760torr)时,肌红蛋白就处于半饱和状态,而血红蛋白的 p_{50} 就高得多了(26torr),反映出它对氧的亲和力要低得多。

从图 3.27 中可看出,处于肺部高 pO_2(约为 100torr)下,肌红蛋白和血红蛋白两者对 O_2 的亲和力都很高,几乎都被 O_2 饱和了。然而,当 pO_2 低于 50torr 以下时,如在肌肉等组织的毛细血管内,由于 pO_2 低(20～40torr),血红蛋白对氧的亲和力降低,它携带的许多 O_2 释放出来,转给了肌红蛋白。正是由于肌红蛋白和血红蛋白对氧的亲和力不同催生了 O_2 由肺到肌肉的一个高效转运系统。

3.5.3　别构作用

血红蛋白是个载体蛋白，虽然不是酶，但类似于一些调节酶。血红蛋白结合和释放氧受到一个特殊的小分子2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphoglycerate,2,3BPG)的调节。由于2,3BPG结合的不是氧结合部位，而是两个β亚基之间空腔内的部位(称为别构部位)，所以2,3BPG被称为别构效应剂。活性受到别构效应剂调节的蛋白质称为别构蛋白，血红蛋白就是一个别构蛋白。

红细胞中2,3BPG与血红蛋白的浓度接近等摩尔(约为4.7mmol/L)。2,3BPG的存在使得氧与全血中成熟的血红蛋白结合的 p_{50} 约提高到26 torr，这比氧与水溶液中纯的血红蛋白结合的 $p50$(约12 torr)高很多。换言之，红细胞中的2,3BPG降低了脱氧血红蛋白对氧的亲和力(图3.28)。

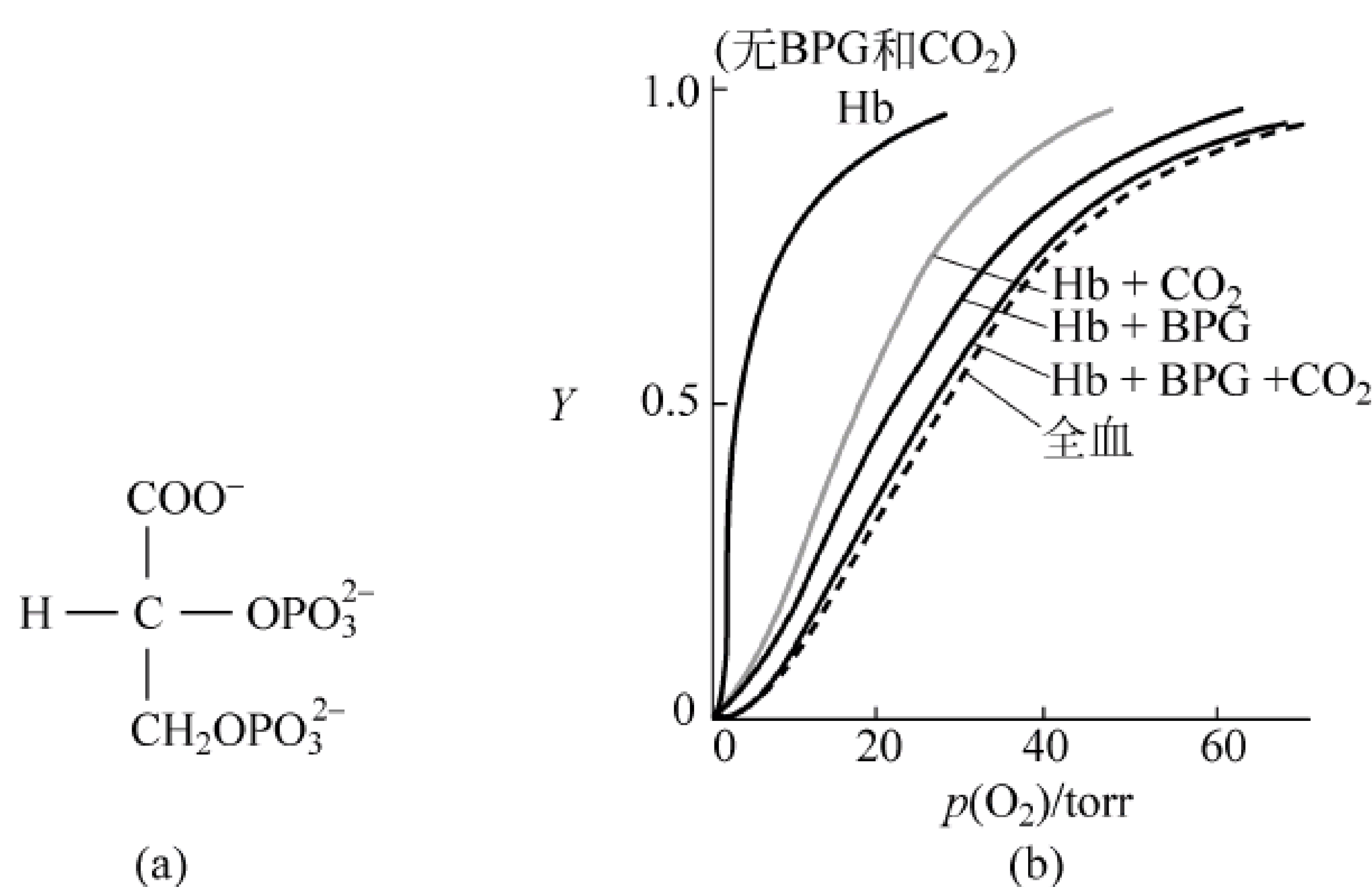


图3.28　2,3BPG对血红蛋白氧合曲线的影响

(a) 2,3BPG结构；(b) 2,3BPG对血红蛋白氧合曲线的影响，没有结合2,3BPG和 CO_2 的Hb的氧合曲线几乎与肌红蛋白的一样，对 O_2 的亲和力比全血中的Hb高得多，当加入2,3BPG或 CO_2，或两者都加入时，氧合曲线明显向右移，表明Hb对 O_2 的亲和力降低了(1torr=133.3Pa)

从图3.29可看到，在缺少2,3BPG时，血红蛋白在氧分压为20torr时就几乎被饱和了。因此，在低氧分压下(组织中20～40torr)，没有2,3BPG血红蛋白就不能卸下结合的氧。然而在等摩尔2,3BPG存在下，血红蛋白在20torr下只有1/3被饱和。2,3BPG的别构效应使得血红蛋白在低氧分压下(组织中)能够释放氧。

2,3BPG对于人们适应较高海拔带来的高原反应起着重要作用。图3.29给出了血红蛋白氧合曲线在高原时的变化，曲线1为适应前的血红蛋白氧合曲线，细胞中的2,3BPG仍约为5mmol/L。深色表示从肺(高原)到组织的氧饱和度变化，显然要比人处于海平面时释放的氧要少。曲线2为适应后氧合曲线，与曲线1相比曲线向右移了，虽然在肺部氧饱和度有所下降，但带来的益处是在周围组织释放的氧更多了。

由于2,3BPG的变化使得几乎每一个到过较高海拔的人们，只要在那里待上一两天就会表现出明显的适应。当然2,3BPG浓度上升的调节只是高原适应性的一个方面，高原适应性还包括红细胞数量的增加及每一个红细胞中血红蛋白数量的增加，在正常情况下需要数周的时间才能较好适应高原缺氧的环境。

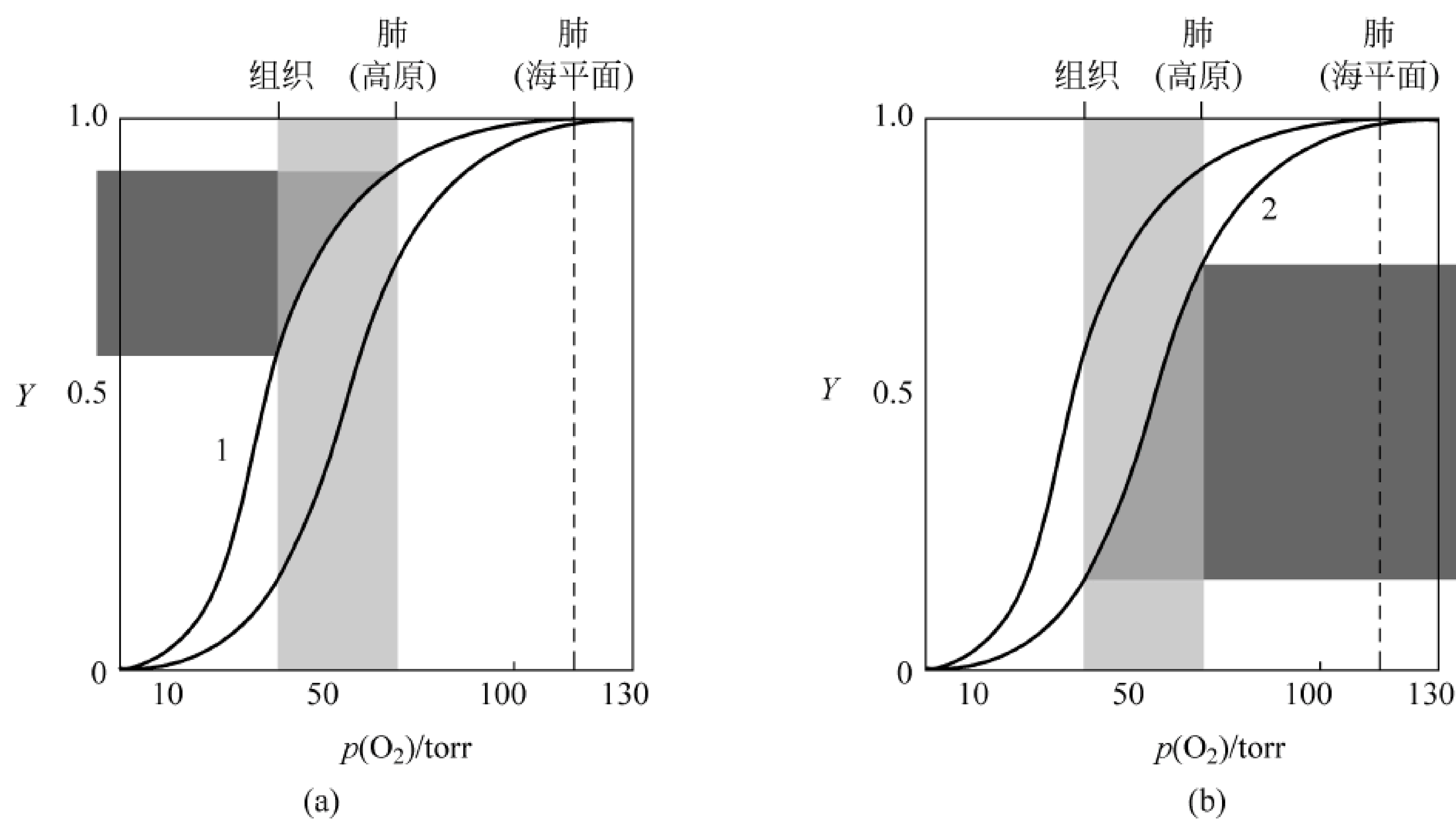


图 3.29 高原血红蛋白氧合曲线变化

(a) 适应前,2,3BPG 约为 4.7mmol/L;(b) 适应后,2,3BPG 约为 8mmol/L 曲线 1 为适应前血红蛋白氧合曲线,曲线 2 为适应后血红蛋白氧合曲线(1torr=133.3Pa)

3.5.4 玻尔效应

氧结合血红蛋白的另一个调节作用涉及 CO_2 和质子(H^+),两者都是有氧代谢的产物。在 20 世纪初,Christian Bohr 观察到红细胞内 CO_2 浓度上升可降低血红蛋白对 O_2 的亲和力。这是由于红细胞内碳酸酐酶(carbonic anhydrase)催化 CO_2 水化生成碳酸(H_2CO_3),碳酸解离形成碳酸氢根离子和 H^+($CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$)。$H^+$ 被血红蛋白接收形成 T 态的离子对,诱导血红蛋白释放 O_2。反过来,如果除去 H^+,使 pH 增加,会促进血红蛋白在低氧分压下结合更多的 O_2,这一现象称为玻尔效应(Bohr effect)(图 3.30)。

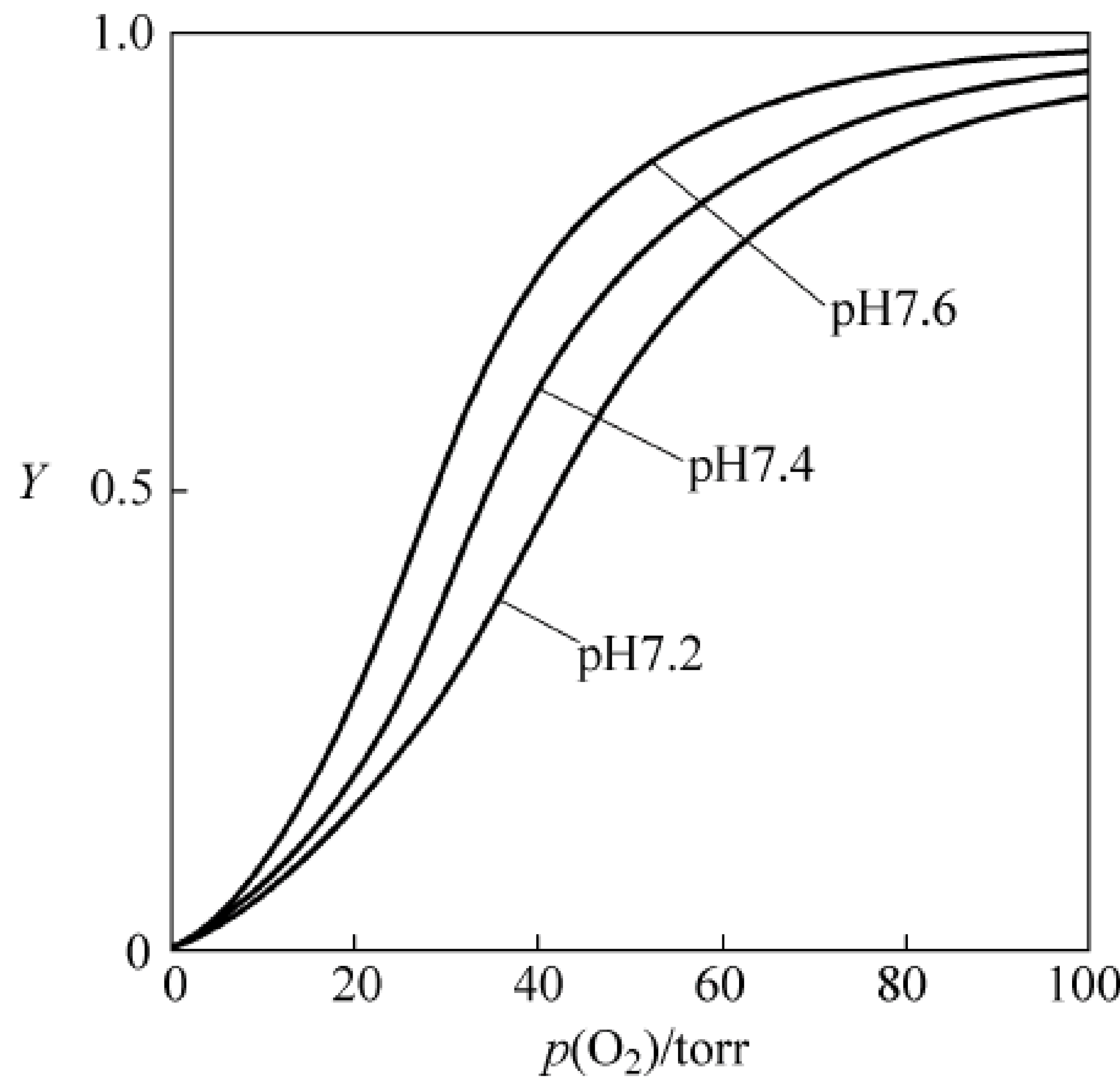


图 3.30 玻尔效应

pH 越低血红蛋白对 O_2 的亲和力也越低(1torr=133.3Pa)

在肺部由于 p_{50} 高，血红蛋白与 O_2 结合破坏了稳定脱氧血红蛋白构象的离子对，形成对 O_2 高亲和力的氧合血红蛋白构象，释放出 H^+，H^+ 与 HCO_3^- 结合排出 CO_2。

在外周组织中除了 H^+ 与 Hb 结合外，CO_2 也可结合在 Hb 中游离 α-氨基上，形成氨甲酸酯，促进脱氧血红蛋白构象形成，利于 O_2 的释放。

3.5.5　镰状细胞贫血

在 1904 年，芝加哥的 James Herrick 医生接待了一名患有严重贫血的黑种人大学生，当检查患者红细胞时发现，除了正常红细胞之外，还存在着许多异常的新月形或镰状细胞（图 3.31）。Herrick 将这种非正常血液病称为镰状细胞贫血（sickle-cell anemia）。镰状细胞不能像正常细胞那样通过毛细血管，血液循环被破坏。另外，镰状细胞易破裂，使红细胞数量减少，这两方面因素导致贫血。

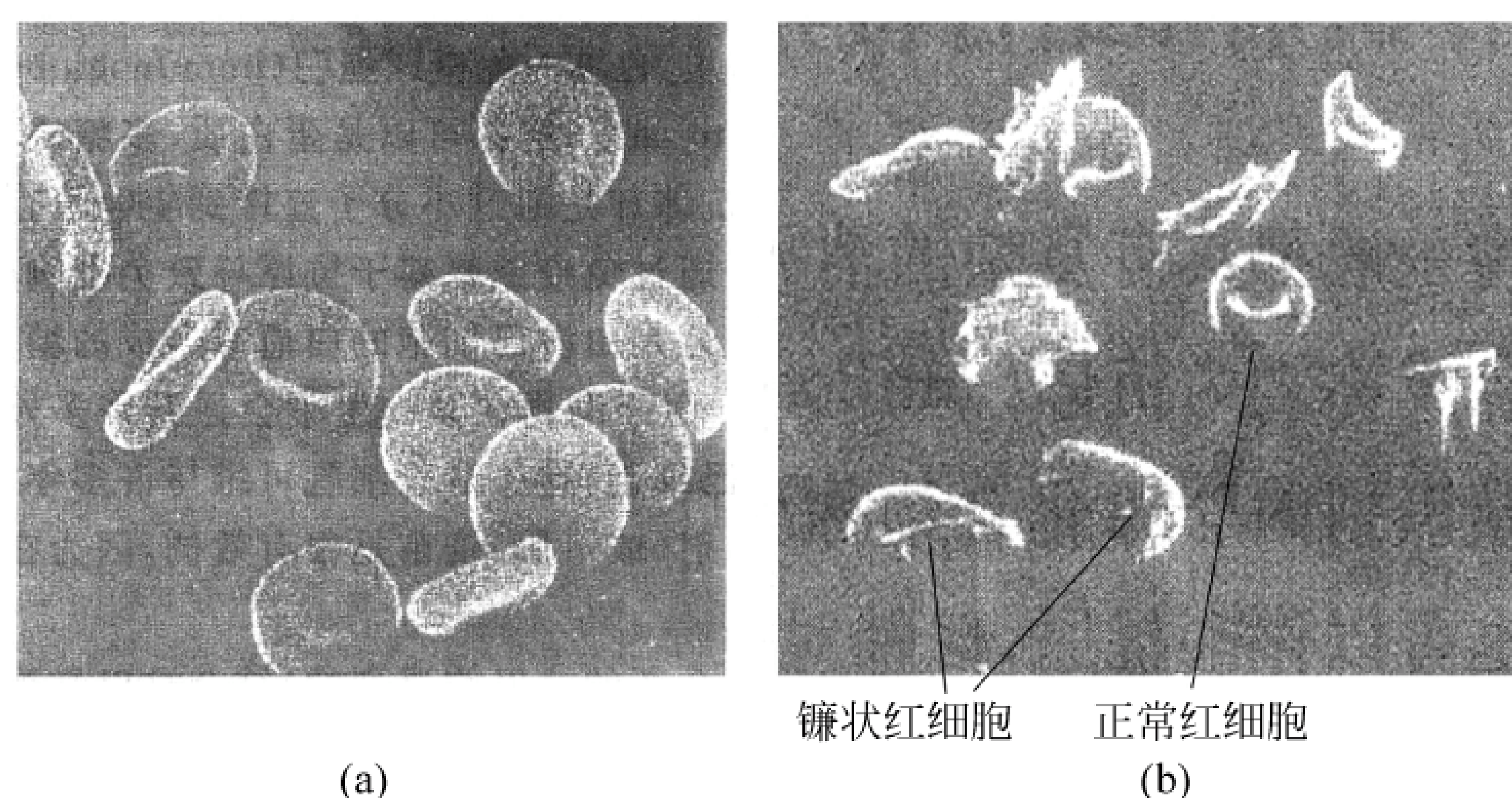


图 3.31　镰状细胞贫血病人的红细胞

(a) 正常人红细胞；(b) 镰状细胞贫血病人的红细胞

约花费了 40 多年的时间才确定镰状细胞贫血病是由于血红蛋白内氨基酸替换的结果。Linus Pauling 等利用电泳-纸层析比较了正常的成熟血红蛋白（Hb A）与镰状细胞血红蛋白（sickle-cell hemoglobin，Hb S）的胰蛋白酶降解片段（图 3.32）。

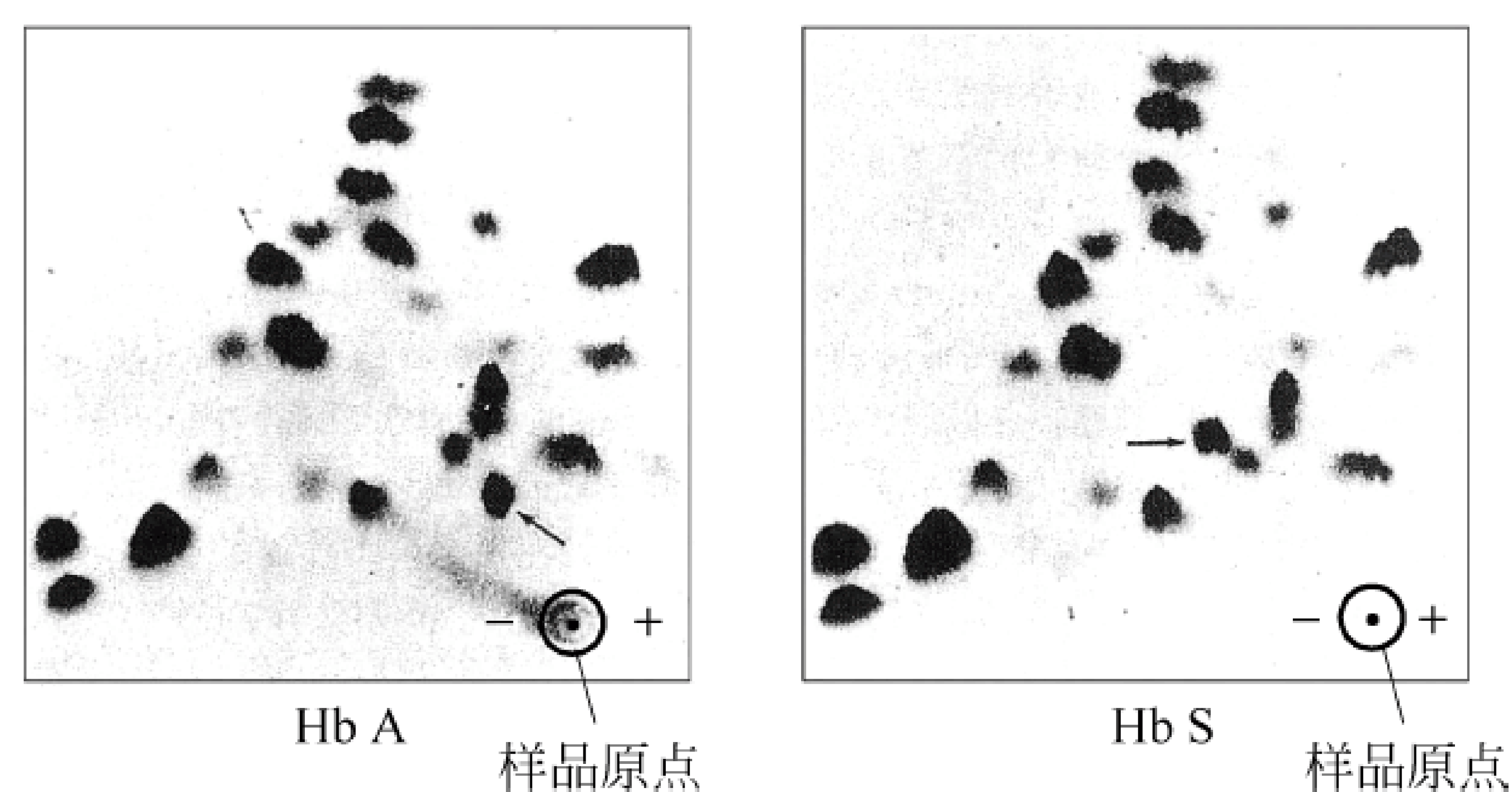


图 3.32　HbA 和 HbS 的胰蛋白酶降解片段电泳-纸层析图

图水平方向为电泳，垂直向为纸层析，图为茚三酮染色图，图中箭头所指斑点为两个血红蛋白中对应的有差异的酶解片段

经对有差异的两个片段进行化学结构分析,确定了它们的氨基酸序列:

β链	1	2	3	4	5	**6**	7	8
Hb A	Val—	His—	Leu—	Thr—	Pro—	**Glu**—	Glu—	Lys
Hb S	Val—	His—	Leu—	Thr—	Pro—	**Val**—	Glu—	Lys

结果表明,Hb A分子的β链第6位氨基酸是Glu,而相应的Hb S分子的β链第6位残基是一个非极性的Val,由于Glu在电泳条件下带负电荷,而Val不带电荷,所以,这也就不难理解为什么电泳时Hb A的该片段要比Hb S相应片段更靠近阳极。

为什么这个Glu被Val取代会产生这么严重的后果呢?原因是疏水的Val(疏水侧链)取代处于分子表面的亲水的Glu(亲水侧链),等于在Hb S分子表面额外增加了一个疏水"粘斑"。当Hb A和Hb S处于脱氧构象时都会暴露出一个由EF拐角(螺旋E和F连接处)处残基形成的疏水口袋(处于氧合构象时该疏水口袋不暴露),这个口袋非常适合相邻Hb S分子Val 6的疏水侧链,结果它们之间相互作用导致Hb S分子聚集成长的、链状的聚合结构,进一步凝聚成含有14~16条链的长螺旋纤维(图3.33)。这些不溶的Hb S纤维的形成使红细胞扭曲变形,呈新月状或镰状。

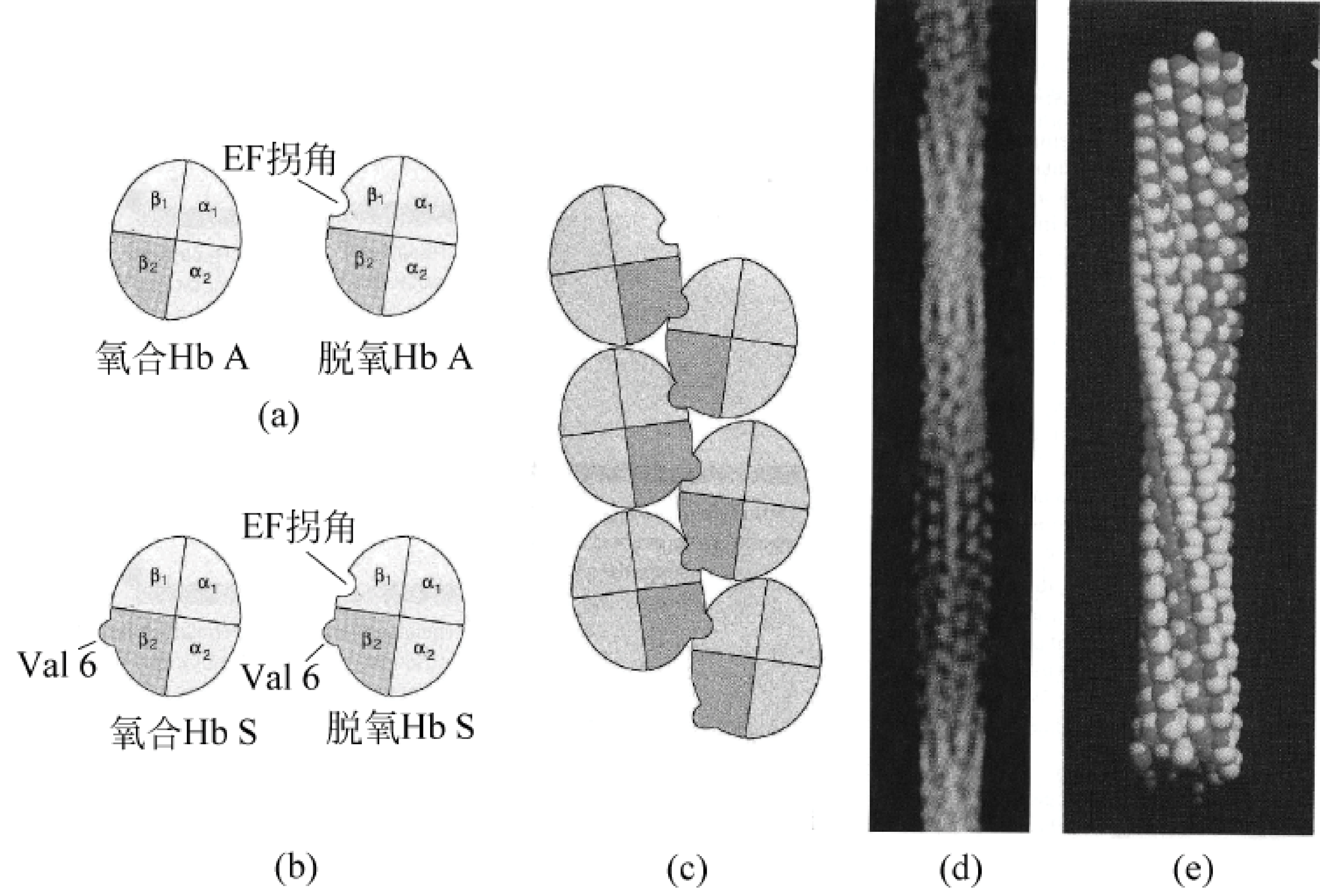


图3.33 脱氧Hb S形成纤维的机制

(a) Hb A氧合和脱氧构象;(b) Hb S氧合和脱氧构象;(c) 相邻Hb S分子的Val 6与EF拐角相互作用形成纤维;(d) 纤维电镜照片;(e) 计算机模拟模型

图中氧合和脱氧Hb S中的Val 6疏水"粘斑"以一个凸起表示,而与它互补的处于β链EF拐角的疏水口袋用一个半圆形缺口表示

镰状细胞贫血在非洲某些地区十分流行,在这些地方,疟疾也最流行。带有镰状细胞的个体对疟疾具有比较强的抵抗力,这是因为疟原虫的部分生活史是在红细胞中度过的,带有镰状细胞的个体的红细胞变化可以防止疟原虫的生长。

3.6 抗体

脊椎动物一般都具有复杂的消灭外来物质的免疫系统,免疫包括细胞免疫和体液免疫两种类型。细胞免疫是通过T淋巴细胞,也称为T细胞(T cell)实现的。T细胞是在胸腺

中发育成熟的，而体液免疫是通过称为抗体(antibody)的蛋白质，也称为免疫球蛋白(immunoglobulin)的不同组合实现的。抗体是由在骨髓中发育成熟的B淋巴细胞或称为B细胞产生的。本节仅对抗体的结构和功能做一简单介绍。

抗体能够特异识别的外源化合物称为抗原(antigen)，抗原可以是蛋白质、多糖或核酸。通过免疫或使宿主暴露于抗原导致免疫响应，可产生大量针对抗原表面不同区域结构的抗体，抗体是由B淋巴细胞(B细胞)产生的。每种淋巴细胞和它的后代都合成相同的抗体。由于动物在其一生中会遇到许多外源物质，由此形成了大量的可生产针对性抗体的淋巴细胞，这些淋巴细胞可维持许多年，以至于在以后再感染时也能够响应抗原。给儿童注射(或口服)疫苗之所以很有效，就是因为在儿童时期建立的免疫性能持续到成年期。

免疫球蛋白分为5类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中在血液中含量最丰富的是IgG。IgG的空间结构呈Y字形，由两条相同的低分子量的轻链和两条相同的高分子量的重链组成，轻链与重链之间，重链与重链之间都有二硫键连接(图3.34)。

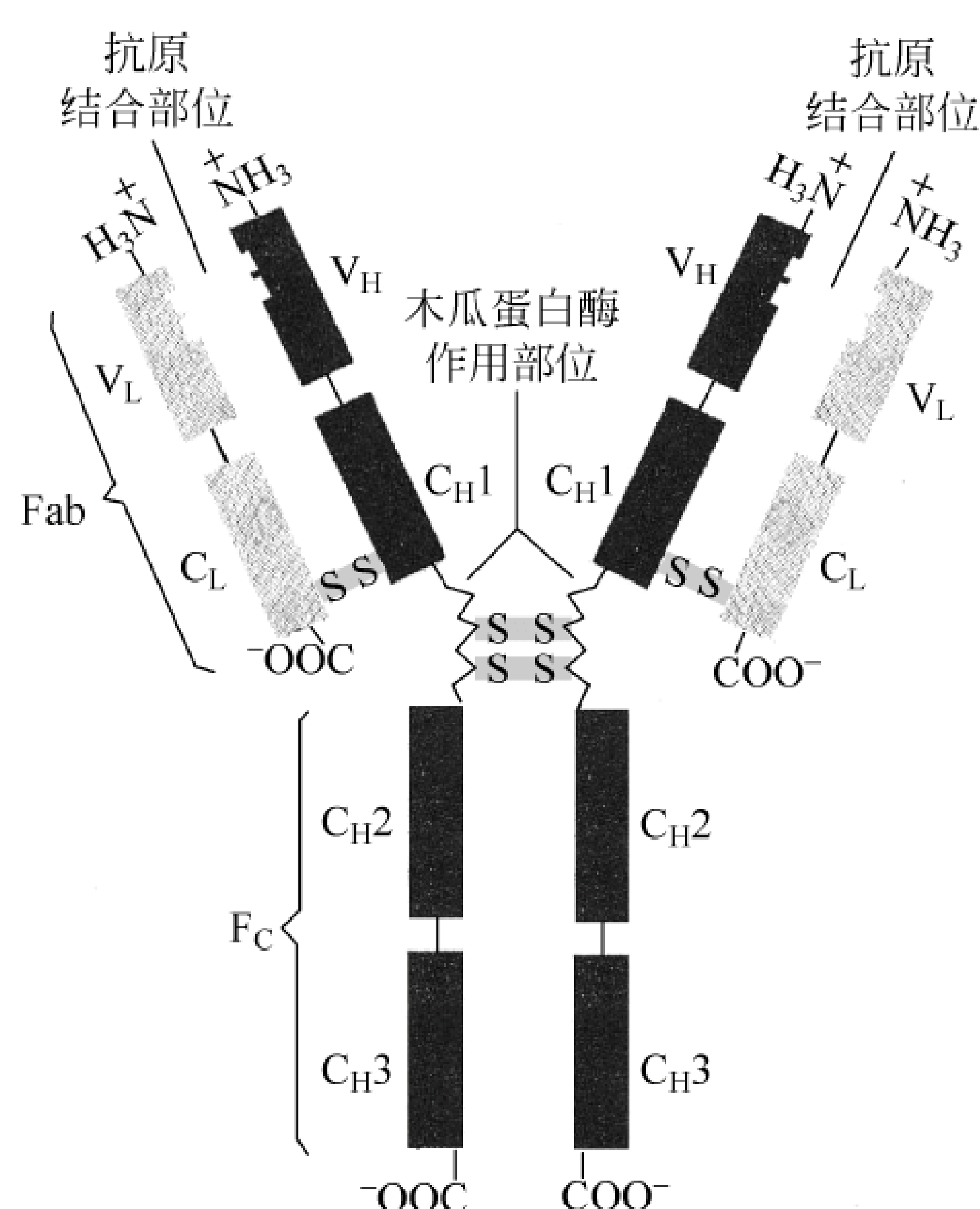


图3.34　人免疫球蛋白IgG结构示意图

V_H为重链可变结构域，V_L为轻链可变结构域，C_H1、C_H2和C_H3为重链的3个恒定结构域，而C_L为轻链恒定结构域

从图3.34中可以看出，一对轻链和重链的N末端靠得很近。轻链含有两个结构域，而重链含有4个结构域，这些结构域都具有类似的超二级结构。氨基酸序列测定表明，免疫球蛋白重链和轻链N末端结构域为可变结构域(variable domain)，因为它们的序列差异很大，N末端结构域决定了结合抗原的特异性。另外，轻链和重链还分别含有氨基酸序列基本不变的一个和三个恒定结构域(constant domain)，糖结合在重链的恒定区。如果用木瓜蛋白酶作用于IgG(图中箭头处)，会生成一个F_C(fragment，crystallizable)片段和两个结合抗原的F_{ab}(fragment，antigen binding)片段。

抗体分为多克隆抗体(polyclonal antibody)和单克隆抗体(monoclonal antibody)，多克隆抗体是识别不同抗原表面决定簇(也称为抗原表位)的各种抗体的混合物，而单克隆抗体

则是只识别抗原中的一个表位的单一抗体。抗原抗体反应形成复合物涉及疏水相互作用、范德华力、氢键和离子间相互作用。抗原抗体反应是特异的,尤其单克隆抗体的特异性更高。由于抗体的特异性,现在抗体已经成为实验室检测或分离微量生物聚合物(生物大分子)常用的试剂。

例如在免疫分析中,常用免疫印迹法(immunobloting)或Western印迹法(Western blotting)测定抗体-抗原复合物的量(图3.35)。其做法是先将含有未知蛋白(抗原)的混合样品经SDS-PAGE分离,然后将凝胶上的蛋白转移到薄膜上(例如硝酸纤维素薄膜),再用标记的抗体(针对未知蛋白的抗体)处理薄膜。通过将未结合的抗体洗净,只留下与未知蛋白结合的抗体,由此确定出未知蛋白在电泳凝胶中的位置,可以为纯化该未知蛋白提供有价值的信息。

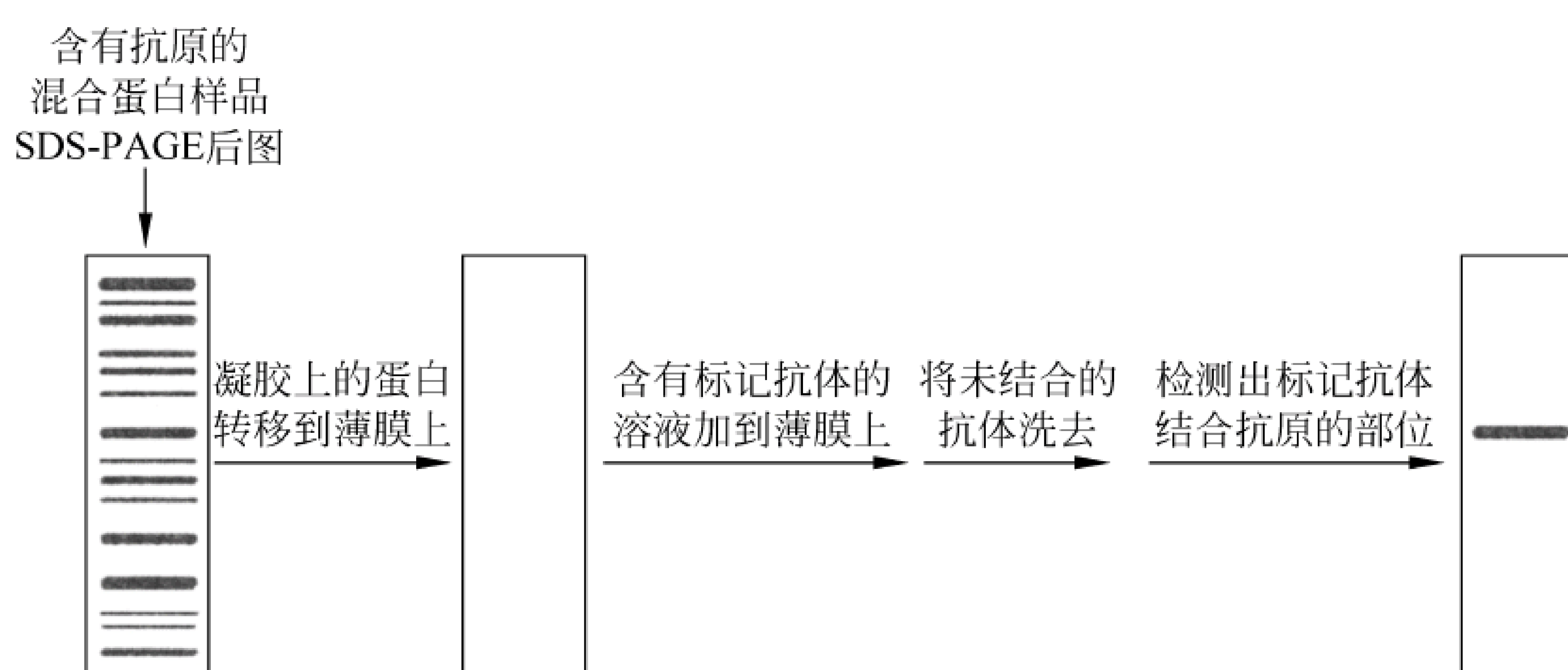


图3.35 免疫印迹法实施过程

小结

1. 蛋白质存在4级结构水平:一级(氨基酸残基序列)、二级(有规则的局部构象,主要通过氢键维持稳定)、三级(一个完整多肽链的紧密形状)和四级结构(两个或两个以上多肽链组装成多亚基蛋白质)。

2. 肽平面是一个极性平面,绕N—C_α和C_α—C键的旋转可以用ϕ和ψ描述。

3. α-螺旋是一种常见的二级结构,每一转螺旋约含有3.6个氨基酸残基。酰胺氢与羰基氧之间的氢键大致平行于螺旋轴。

4. β-折叠片是另一种常见的二级结构,通常由平行β-链或反平行β-链形成平行β-折叠片或反平行β-折叠片。

5. 胶原蛋白是结缔组织中主要的纤维蛋白。胶原蛋白中3条左手螺旋链形成一个右手超螺旋。

6. α-螺旋和β-折叠片的一些特定组合形成可识别的超二级结构(基序)。蛋白质的三级结构通常由一个或数个结构域构成,这些结构域具有可识别的结构和特定功能。

7. 在具有四级结构的蛋白质中,亚基通常通过非共价键相互作用聚集在一起。

8. 一个蛋白质的天然构象受到一些物理或化学作用时,会导致构象变化,活性丧失。而在一定条件下变性蛋白有可能复性。

9. 一个蛋白质折叠成它的生物活性状态是一个最初由疏水效应驱动的有次序的和协同的过程，有的蛋白质折叠还需要伴侣蛋白协助。

10. 含有血红素的肌红蛋白和血红蛋白都能结合和释放氧。肌红蛋白的氧合曲线为双曲线型，而血红蛋白为S形。氧与血红蛋白结合具有正协同性和别构调节作用。2.3BPG结合脱氧血红蛋白降低血红蛋白的氧亲和力，而 CO_2 浓度通过Bohr效应促进氧脱离血红蛋白。

11. 抗体是一类具有能够结合抗原的多结构域的蛋白质。处于抗体的重链和轻链末端的可变结构域与抗原相互作用。

习题

1. 为什么在α螺旋中一般都看不到(a)Gly和(b)Pro残基？

2. 描述(a)一个α-螺旋，(b)一个胶原3股螺旋的氢键特征。

3. 肌红蛋白含有8个α螺旋，其中一个的序列如下。

-Gln-Gly-Ala-Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-His-Phe-Arg-Lys-Asp-Ile-Ala-Ala-

哪个侧链有可能是位于面向蛋白质内部的螺旋的侧面？哪一个有可能面向水相溶剂？说明面向内部的常见的间隔。

4. 称为Betanova的20个氨基酸多肽被认为是在缺少二硫键下理论上可形成稳定β折叠结构的小的可溶性分子，其序列为：RGWSVQNGKYTNNGKTTEGR。溶液中Betanova的NMR表明事实上它的确可形成一个3股反平行的β折叠。

(a) 画一个Betanova的带型图，指出可能出现在β链之间每一个发卡环中的残基。

(b) 给出认为是稳定这一β折叠结构的相互作用。

5. 通过烫发使头发成形，请从生物化学角度解释烫发的原理。

6. 1mmol某纯蛋白质（MW＝60 000）与6mmol巯基乙醇正好完全反应，只生成一种纯的大分子组分(MW＝20 000)。从该反应得到的数据推测该蛋白质的组成和结构。

7. 曼氏血吸虫的幼虫通过浸入皮肤感染人。幼虫分泌一种可切断序列-Gly-Pro-X-Y-(X和Y可以是几种氨基酸的任一个)中残基X和Y之间的肽键。为什么这个酶活性对寄生虫这么重要呢？

8. 向小鼠体内注射 ^{14}C 核素标记的4-羟脯氨酸，在小鼠的胶原纤维中未检测到 ^{14}C 核素。然而当注射 ^{14}C 核素标记的脯氨酸时，小鼠的胶原纤维中检测到 ^{14}C 核素。请解释原因。

9. 某蛋白含两个亚基，每个亚基都包含3个二硫键，假设二硫键是随机形成的。使这个二聚体蛋白的天然构象恢复(具有生物学活性)的几率是多少？

10. 解释为什么救助严重的一氧化碳中毒的人时往往是输血而不是输氧？

11. 鳄鱼不呼吸在水下可以待1个小时，将捕获的动物淹死，然后在空闲时吃。有助于鳄鱼这样做的理由是鳄鱼能够100％地利用血液里的氧气，而人约只能利用血液中氧气的65％，而且鳄鱼的Hb不结合BPG。然而鳄鱼血红蛋白能很好地结合 HCO_3^-。这是怎样帮助鳄鱼获得美餐的呢？

12. Hb A抑制Hb S形成细长纤维，即红细胞在脱氧后的“镰状化”，这是什么道理？

4 酶

酶(enzyme)是高效、高特异性的生物催化剂，绝大多数酶是活细胞产生的蛋白质，具有球蛋白的主要特征。酶催化反应条件温和(常温、常压)，酶催化的反应，或称为酶促反应，要比相应的没有催化剂的反应快 10^3～10^{17} 倍。例如在 0℃时，1mol 过氧化氢酶能使 5×10^6 mol H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2；而在同样条件下，1g 铁离子只能使 6×10^{-4} mol H_2O_2 分解，酶催化反应比无机催化剂铁离子催化的反应快了 10^{10} 倍。

酶的催化作用具有高度特异性，有些酶只作用于一种或一类底物(底物是指酶作用的反应物)，如脲酶只水解尿素，淀粉酶水解淀粉。而一般的催化剂对其作用物无严格的选择性。酶的特异性分为绝对特异性、相对特异性和立体异构特异性。所谓绝对特异性是指酶只催化一种或两种结构极相似的化合物，如脲酶只催化尿素水解。相对特异性是指酶可作用于一类化合物或一种化学键，如脂肪酶或酯酶催化酯键水解，对酯键两侧的基团要求不严格，对很多有机酸和醇(或酚)形成的酯键都能水解。

立体异构特异性指酶作用的底物应具有特定的立体结构才能被催化，包括光学异构性和几何异构性。光学异构性是指一种酶只能催化一对镜像异构体中的一种，而对另一种不起作用，例如精氨酸酶只催化 *L*-精氨酸水解生成 *L*-鸟氨酸和尿素，而对 *D*-精氨酸没有作用。几何异构性是指立体异构中的顺式和反式、α-构型和 β-构型等，例如延胡索酸酶只能催化延胡索酸(反丁烯二酸)加水生成苹果酸，对顺丁烯二酸不起作用。

第一个分离出的酶是脲酶。J. B. Sumner 于 1926 年从刀豆中纯化，并得到了脲酶晶体。Sumner 证明脲酶是蛋白质。1929 年 J. H. Northrop 又结晶出了胃蛋白酶，也证明它是一种蛋白质，人们才逐渐地接收酶是一种具有催化活性的蛋白质这一概念。Sumner 和 Northrop 及 Stanley 因酶学上的贡献获得了 1946 年的诺贝尔化学奖。到目前为止，所发现的酶几乎都是蛋白质或带有辅助因子的蛋白质。然而，某些 RNA 分子也表现出催化活性，将在本书的 RNA 合成一章予以介绍。

4.1 酶的分类

大多数酶都是根据酶催化的反应命名的，如催化水解反应的酶称为水解酶，催化脱氢反应的酶就叫脱氢酶等。也有一些酶是根据作用的底物命名的，如水解淀粉的酶就称淀粉酶，而水解核酸的酶就称核酸酶等。还有少数一些酶是根据酶的来源命名的，例如胰蛋白酶来自胰腺，胃蛋白酶来自胃等。

国际生物化学协会为了使酶的命名标准化，将酶按照酶催化的有机化学反应类型分为如下 6 类。

(1) 氧化还原酶(oxidoreductases)：催化氧化还原反应。其中的大多数酶称为脱氢酶，有一些也称为氧化酶、过氧化酶、加氧酶或还原酶。例如乳酸脱氢酶催化的乳酸与丙氨酸的相互转换反应(图 4.1)。

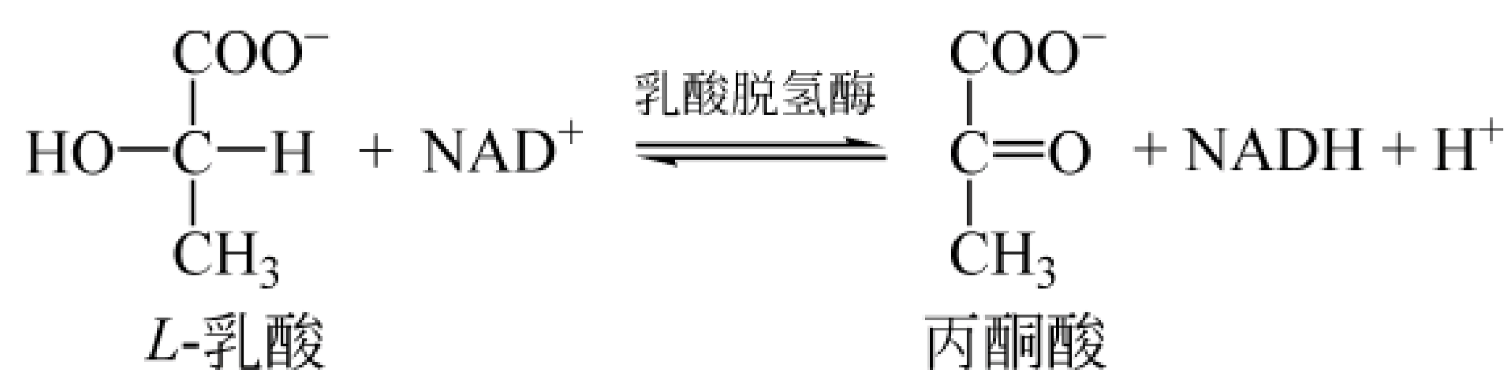


图 4.1 乳酸脱氢酶催化的反应

(2) 转移酶(transferases)：催化功能基团从一个底物转移到另一个底物的反应。其中许多转移酶需要辅酶。通常底物分子的一部分与酶或辅酶共价结合，这类酶包括激酶。例如常见的氨基转移反应(图 4.2)。

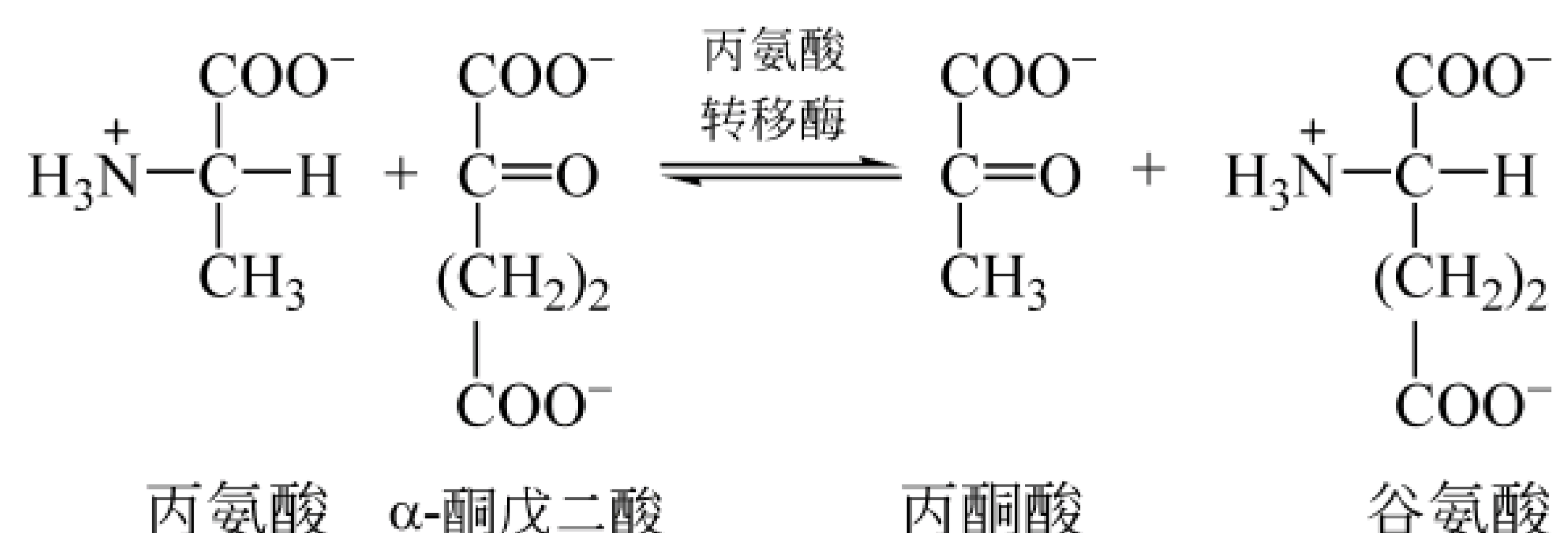


图 4.2 氨基转移酶催化的反应

(3) 水解酶(hydrolases)：催化水解反应。这是特殊的一类转移酶，水作为转移基团的受体。例如焦磷酸酶催化的焦磷酸水解反应(图 4.3)。

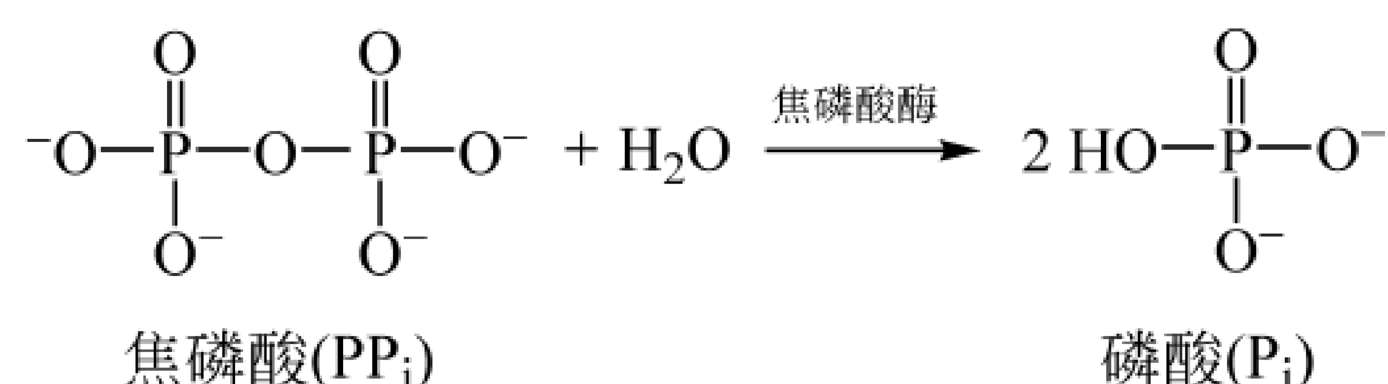


图 4.3 焦磷酸酶催化的反应

(4) 裂合酶(lyases)：也称为裂解酶，催化分子裂解或移去基团的反应。催化细胞内加成反应的裂合酶常命名为合酶(synthases)。例如丙酮酸脱羧酶催化的丙酮酸脱羧反应(图 4.4)。

(5) 异构酶(isomerase)：催化一种同分异构体转变为另一种同分异构体的反应。这类反应是最简单的酶促反应，因为反应只有一个底物或一个产物。例如，丙氨酸消旋酶催化的 *L*-丙氨酸与 *D*-丙氨酸之间相互转换反应(图 4.5)。

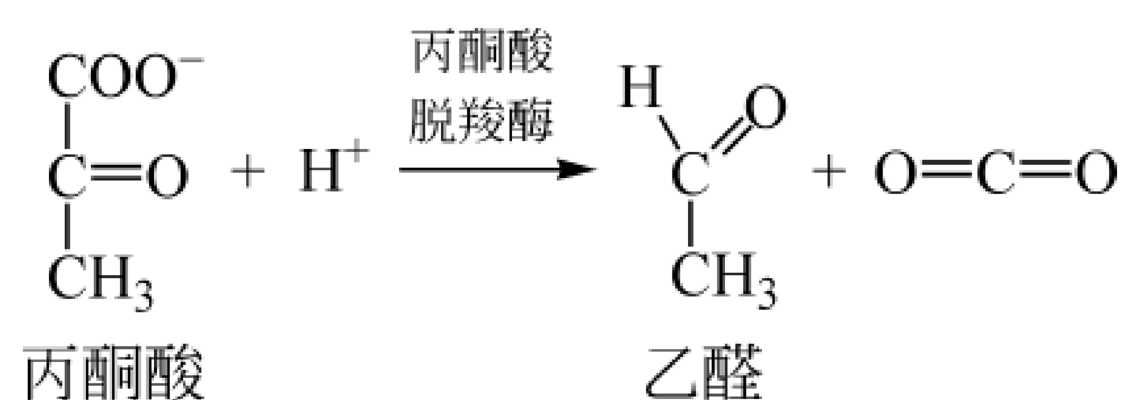


图 4.4 丙酮酸脱羧酶催化的反应

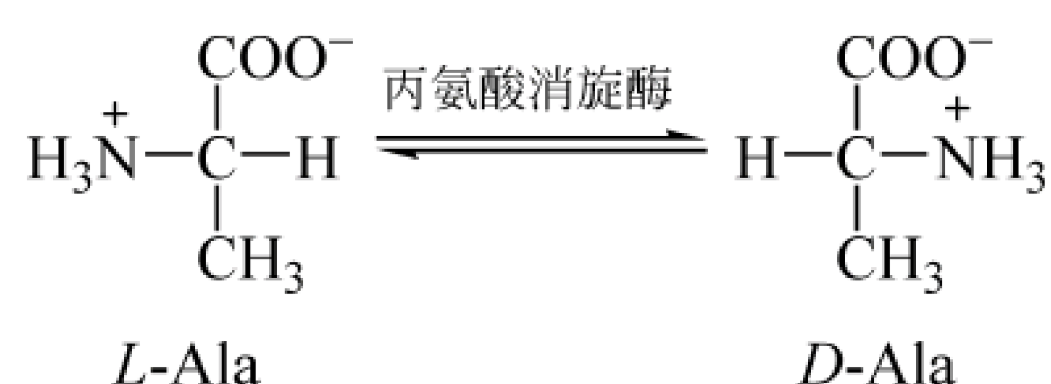


图 4.5 丙酮酸消旋酶催化的反应

(6) 连接酶(ligases):催化两个底物的连接或交联反应,反应与ATP等三磷酸核苷中的焦磷酸键的水解反应偶联。连接酶也常称合成酶(synthetase)。例如谷氨酰胺合成酶催化的谷氨酸生成谷氨酰胺的反应(图4.6)。

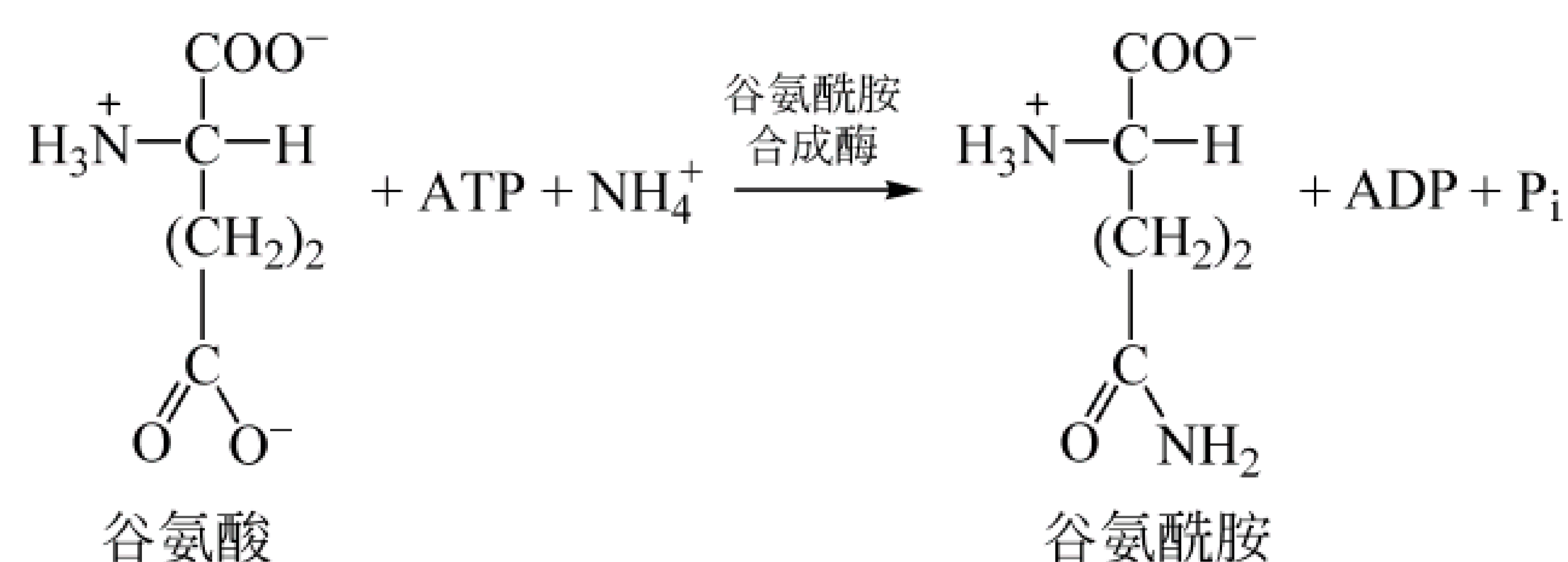


图4.6 谷氨酰胺合成酶催化的反应

每一大类酶又分若干亚类、亚亚类,每个亚亚类又包括若干个酶。所以,每一种酶都有由4个数字组成的惟一编号,例如乳酸脱氢酶的编号为EC1.1.1.27

4.2 酶活性与比活

绝大多数酶是具有催化功能的球蛋白,所以在蛋白质一章中介绍的各种纯化方法同样适用于酶的纯化。但由于酶活性易受温度的影响,所以酶的纯化一般都是在4℃左右的低温条件下进行的。如果在纯化过程中需要使用有机溶剂,应当在−15℃以下进行,因为有机溶剂容易使酶失活,低温可以减少酶活性的损失。酶纯化过程中还必须随时监测酶的活性,以便纯化工作能正确地进行。

酶活性(enzyme activity)也称为酶活力,是指酶催化指定化学反应(酶促反应)的能力。酶活力的大小可以用在一定条件下酶促反应的速度来表示,反应速度愈快,就表明给定的酶溶液或组织提取液中的酶活力愈高。所以,酶活力的测定就是要测定酶促反应的速度。通过测定反应中单位体积中底物的减少量或产物的增加量可以得到酶促反应速度。但一般是选择测定产物的增加量,因为酶促反应中,底物往往是过量的,不容易测准它的减少量。而产物的生成量只要方法足够灵敏,容易准确测得。

酶活力的大小用酶活性单位(U,active unit)的多少来表示。按照国际酶学会议的规定,1U是指在25℃、测量的最适条件(如pH及底物浓度等)下,1min内能引起1μmol底物转化的酶量。而术语"酶活力"指的是溶液或组织提取液中总的酶单位数。

在酶的纯化过程中还常用到另一个术语"比活"(specific activity),比活是指每毫克蛋白含有的酶活单位数。随着酶纯化的进行,比活会越来越高,当酶已被纯化至纯酶时,比活是个恒定值,所以比活是酶纯化程度的指标。

在一般的酶纯化过程中,纯化的每一步都要测定酶活力以及总的蛋白质量,两者的比值就是纯化至这一步时得到的比活。随着纯化的进行,酶活力和总蛋白量都要逐渐减少。纯化的目的是要将一些非靶蛋白,即杂蛋白尽可能地去除掉,但在去除杂蛋白的同时也会损失一些靶蛋白,不过总蛋白的减少量要比减少的酶活力大得多,所以酶越来越纯,比活自然越来越高。表4.1给出了从粗糙脉孢菌纯化黄嘌呤脱氢酶过程中几步主要步骤中测得的酶活力、总蛋白、比活和回收率。从中可以看出随着纯化的进行,酶的比活越来越高。

表 4.1 黄嘌呤脱氢酶纯化数据

纯化步骤	级分体积/mL	总蛋白/mg	活力/U	比活/(U/mg)	回收率/%
1. 粗提取液	3800	22 800	2400	0.108	100
2. 盐析	165	2800	1190	0.425	46
3. 离子交换层析	65	100	720	7.2	29
4. 凝胶层析	40	14.5	555	38.3	23
5. 亲和层析	6	1.8	275	152	11

(来源：Lyon,E. S. ,and Grrarett,R. H. *Journal of Biochemistry*. ,1978,253：2604-2614)

4.3 酶活性部位

酶分子一般都很大,真正起催化作用的部位只是酶分子中结合和催化底物的活性部位(active site)。活性部位是多肽链折叠形成的一个特殊的空间结构,一些在氨基酸序列上相距很远的氨基酸残基经折叠靠近,有的就是活性部位的组成成分,直接参与酶的催化作用。对活性部位没有直接贡献的其他部位是形成和稳定酶天然结构所需要的。

酶活性部位通常位于酶蛋白的两个结构域或亚基之间的裂隙(cleft 或 crevice),或蛋白质表面的凹槽,含有结合底物、参与催化,并将底物转化为产物的一些氨基酸残基。结构研究已经证明,说到一个酶的活性部位裂隙一般总是与疏水性氨基酸残基联系在一起的,可以说活性部位是一个疏水裂隙。但裂隙中也会发现少量极性、可离子化氨基酸残基,它们起着化学催化剂作用,直接参与酶催化过程。

表 4.2 给出了在酶的活性部位发现的可解离的和具有反应性的氨基酸残基及其作用。组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸参与质子的转移。某些氨基酸,例如丝氨酸和半胱氨酸具有从一个底物共价转移基团到第二个底物的反应性。在中性 pH 下,天冬氨酸和谷氨酸通常都带有负电荷,而赖氨酸和精氨酸带有正电荷,这些阴离子和阳离子可以作为用于底物上带有相反电荷基团结合的部位。

表 4.2 可解离氨基酸的催化作用

氨基酸	反应基团	pH7.0 带电量	主要作用
Asp	$—COO^-$	−1	结合阳离子,质子转移
Glu	$—COO^-$	−1	结合阳离子,质子转移
His	咪唑基	近似 0	质子转移
Cys	$—S^-$	近似 0	酰基的共价结合
Tyr	—OH	0	与配体形成氢键
Lys	$—\overset{+}{N}H_3$	+1	结合阴离子
Arg	胍基	+1	结合阴离子
Ser	$—CH_2OH$	0	酰基的共价结合

图 4.7 给出了溶菌酶活性部位的示意图,活性部位为一裂隙,包括直接参与催化作用的在一级序列相距很远,但在活性部位相距很近的 35 位 Glu 和 52 位的 Asp 两个关键氨基酸残基。此外,还包括在裂隙入口处的 62 位和 63 位的 Trp,以及 101 位 Asp 和 107 位 Ala 等氨基酸残基。

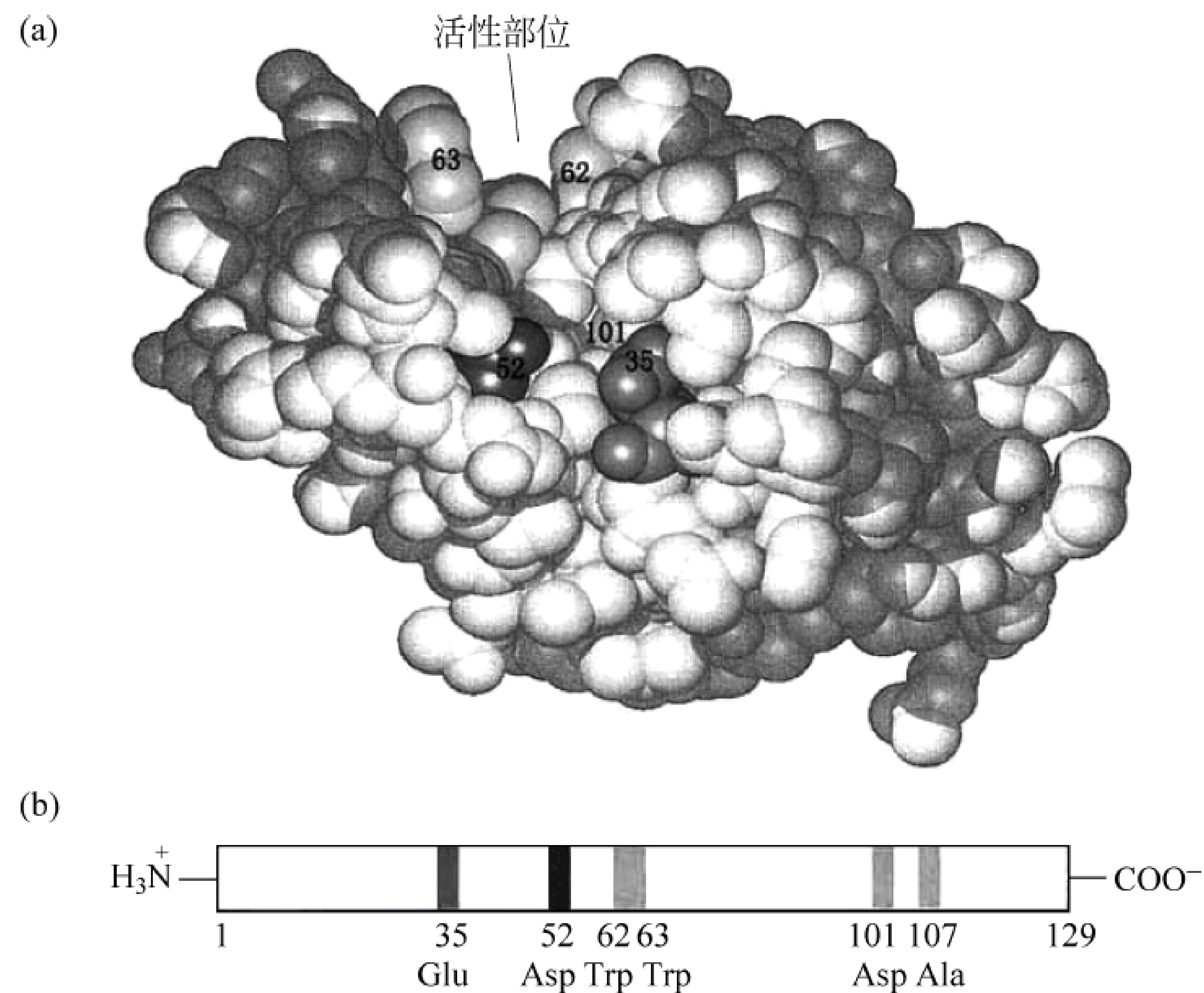


图 4.7 溶菌酶活性部位的示意图

(a) 表示溶菌酶活性部位裂隙的球形图,包括35位、52位、101位及62和63位氨基酸残基(107位残基没有给出);(b)表示处于活性部位的各个残基在一级序列中的排序

酶的活性部位又是如何与底物结合的呢? 1894年 Emil Fischer 提出一种直接契合(direct fit)模式,酶和底物的关系就像锁与钥匙那样结合在一起(图4.8)。就是说酶分子的活性部位的形状刚好与底物形状互补的所谓一种几何互补(geometric complementarity),或者是活性部位的氨基酸残基与底物一些基团通过所谓的电性互补(electronic complementarity)的专一吸引作用方式结合。

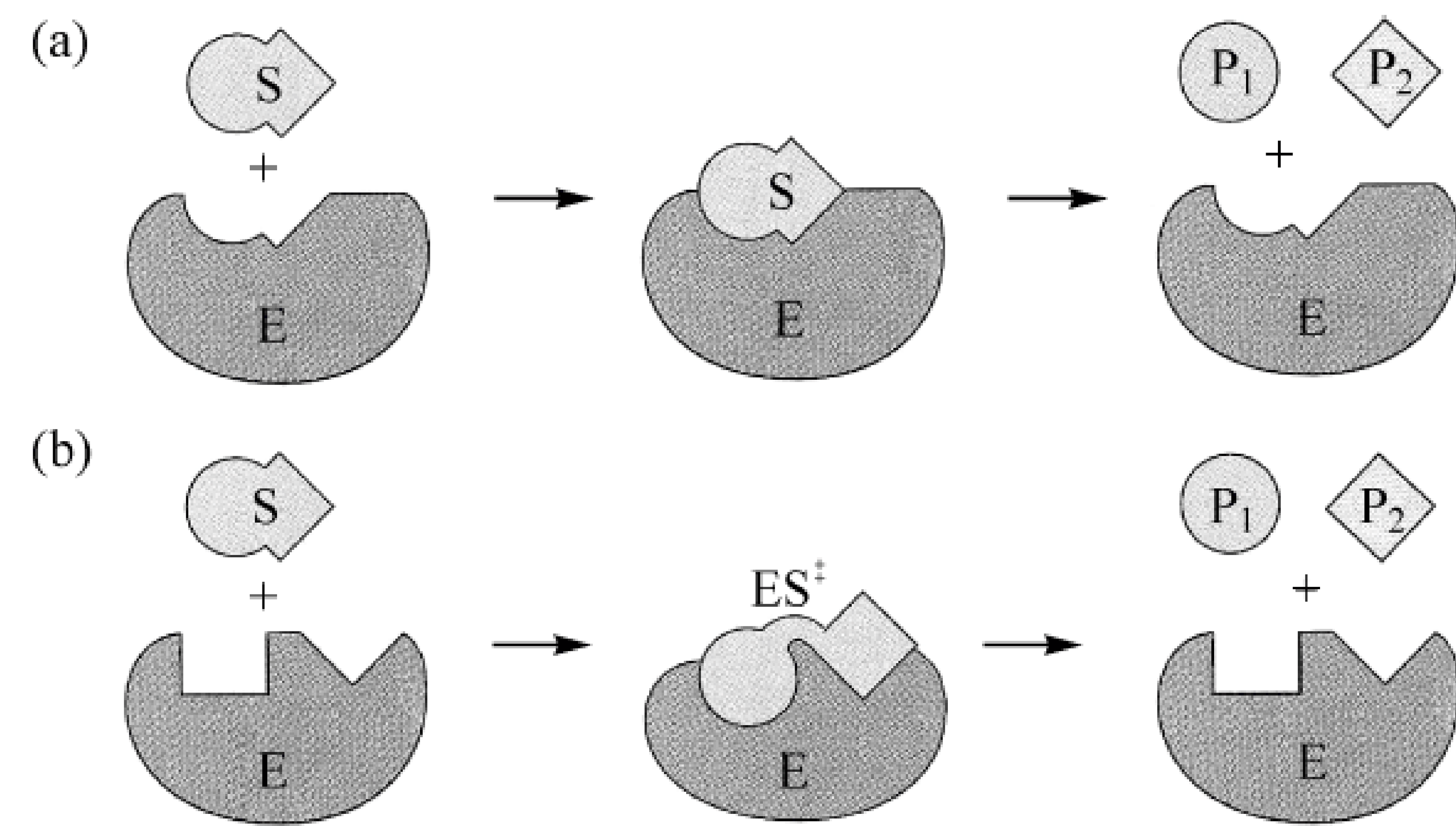


图 4.8 酶与底物结合的两种模式

(a) 直接契合模式;(b) 诱导契合模式

E为酶,S为底物,$ES^‡$为过渡态,P_1和P_2为产物

锁钥学说在理解某些酶的催化特征时仍然有意义,但X射线研究证明大多数酶的活性部位在底物结合时都会发生构象改变。所以现在有关酶与底物结合的解释普遍被人们所接受的是1958年由 Daniel Koshland 提出的诱导契合(induced fit)学说。按照该学说,酶与底物相互作用,酶和底物都发生变形,底物的结合诱导酶的构象发生了变化,转变为更有利于

与底物过渡态结合的能增强酶催化能力的构象，酶与底物真正互补。

4.4　活化能

任何一个反应，例如 S→P 都可以用相应反应坐标图表示(图 4.9)，其中 S 代表底物，或称为反应物，P 代表产物，纵坐标表示自由能(G)，横坐标为反应坐标。从图中可以看到，S 和 P 都含有一定的自由能，即处于稳定的基态(ground state)。S 和 P 之间的平衡反映了它们的基态自由能的差别。但一个有利的平衡并不意味着 S 转化为 P 就快，因为它们之间还存在着像座“山”那样的能障，反应的底物必须提高能量水平才能跨越能障。“山”顶处称为过渡态(transition state)，用 $X^{‡}$ 表示，过渡态是底物转化为产物所经历的一种状态。

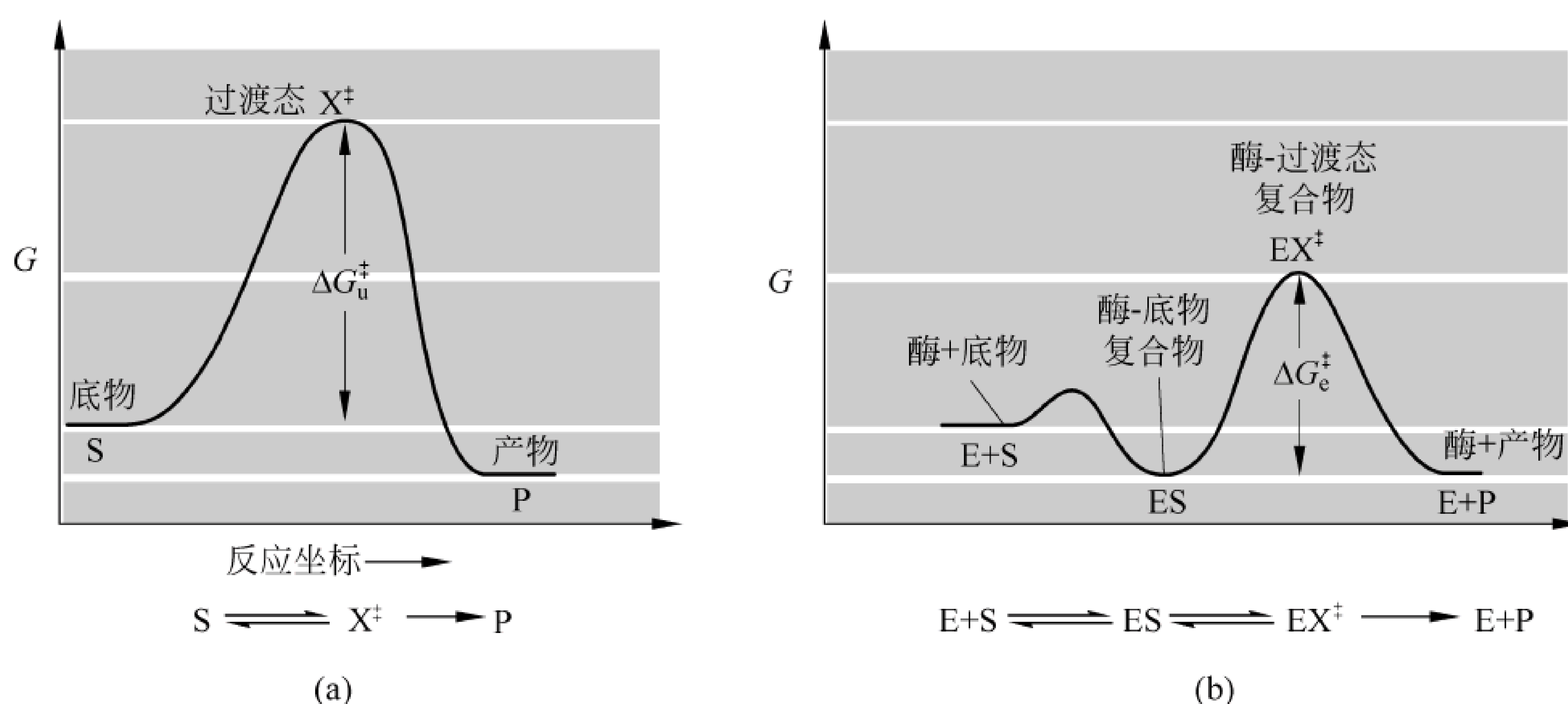


图 4.9　酶催化反应

(a) 非催化反应；(b)酶催化反应，$\Delta G_e^{‡}$低于非催化反应 $\Delta G_u^{‡}$

基态与过渡态之间的能量差称为反应的活化能(activation energy，$\Delta G^{‡}$)，显然活化能越高，能够达到过渡态的底物分子越少，反应速度也越低，达到反应平衡所需时间也就越长。

有两个措施可以使底物克服活化能障转化为产物，一个是升高反应温度，反应温度提高，虽然没有降低活化能，但增加了具有克服活化能障的底物分子数，一般来说温度每提高10℃，反应速度就提高 1 倍。

另一个加快反应速度的措施是使用催化剂，催化剂通过使活化能降低同样可提高反应速度。从图 4.9(b)可看到酶通过形成底物-过渡态复合物(ES)降低了底物和过渡态之间的能障，复合物经由过渡态 $EX^{‡}$ 转化为产物。很显然，$EX^{‡}$ 的能量要比 $X^{‡}$ 的低，酶存在下的反应活化能 $\Delta G_e^{‡}$比非催化反应时的 $\Delta G_u^{‡}$低。降低了反应活化能，也就提高了反应速度，所以酶催化效率更高。

4.5　酶催化机制

通过对很多酶催化反应的研究，已经了解到酶催化特异反应的几种催化机制：酸碱催化(acid-base catalysis)、共价催化(covalent catalysis)、金属离子催化以及靠近和定向效应。

1. 酸碱催化

这里的酸碱催化指的是广义酸碱催化,就是一种质子转移的催化机制,给出质子为酸,接收质子为碱,所以酸碱催化总是同时发生的。而仅通过水中存在的 H^+ 或 OH^- 的催化模式为狭义酸碱催化。

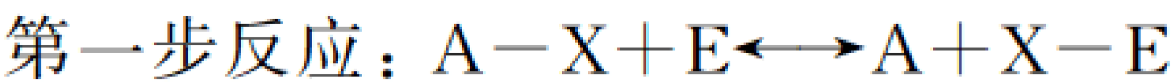
酶活性部位的一些氨基酸残基同样可作为质子供体或受体,参与质子转移,使反应速度提高 $10^2 \sim 10^5$ 倍(图 4.10),就是说酶活性部位提供了一个相当于酸或碱溶液的生物环境,实际上酸碱催化普遍存在于酶促反应中。例如酶活性部位的 His,在生理 pH 下给出一个质子充当酸催化剂,结合一个质子就充当碱催化剂。另外,Ser 等残基侧链在一定条件下也可充当酸催化剂。

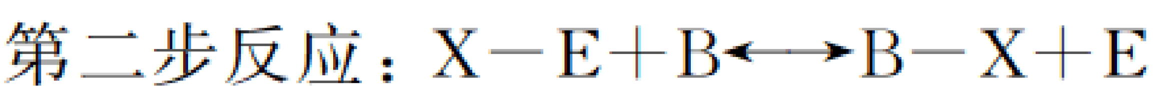
氨基酸残基	广义酸形式(质子供体)	广义碱形式(质子受体)
Glu, Asp	R—COOH	$R—COO^-$
Lys, Arg	$R—N^+H_3$	$R—\ddot{N}H_2$
Cys	R—SH	$R—S^-$
His	R—C=CH, HN, C(H), N^+H (咪唑环)	R—C=CH, HN, C(H), N: (咪唑环)
Ser	R—OH	$R—O^-$
Tyr	R—(苯环)—OH	R—(苯环)—O^-

图 4.10 在活性部位参与酸碱催化的氨基酸残基

2. 共价催化

共价催化最大特点是通过酶与底物生成瞬间共价键,借助于酶进行基团转移来加快反应速率。例如 A—X→B—X 的反应,在酶作用下基团 X 首先从 A—X 转移到 E(酶),形成 X—E 复合物。然后 X 再从 E—X 转移到 B,形成 B—X,完成 X 转移反应,酶恢复原来状态。





共价催化是生物化学中将两个不同反应偶联的普遍机制。例如细菌蔗糖磷酸化酶催化的反应就是一个通过共价催化的典型的酶反应。蔗糖是由一个葡萄糖残基和一个果糖残基构成的二糖。



第一步反应是形成共价连接的相当于 X—E 的葡糖-酶中间反应物,蔗糖相当于 A—X,而葡萄糖相当于 X。



在第二步反应中,葡糖-酶将葡萄糖转移给相当于 B 的 P_i,形成葡糖-1-磷酸(相当于 B—X)。



3. 金属离子催化

到目前为止,在已知的酶中有将近 1/3 的酶需要金属离子才能表现出最大的催化活性。如果酶紧密结合或者需要金属离子维持它的天然活性状态,这样的酶称为金属酶(metalloenzyme),例如含 Mo^{2+} 的固氮酶,含 Cu^{2+} 的细胞色素氧化酶。而那些与金属离子松散结合,也许只是在酶催化循环中出现,这样的酶称为金属活化酶(metal activated enzyme),例如己糖激酶催化时就需要 Mg^{2+},因为与 ATP 相比,Mg-ATP 复合物是更好的底物。

金属酶和金属活化酶中金属离子在许多方面起着与辅酶同样的作用,当然还具有辅酶不具有的特性,例如金属离子可通过可逆的氧化态变化参与氧化还原反应(表 4.3)。

表 4.3　金属和微量元素在酶中的主要作用

金　属	酶	金属的作用
Fe	细胞色素氧化酶	氧化还原
Cu	抗坏血酸氧化酶	氧化还原
Zn	醇脱氢酶	帮助酶结合 NAD^+
Co	谷氨酸变位酶	Co 是钴胺素辅酶的一部分
Mn	组氨酸脱氨酶	通过吸引电子帮助催化
Ni	脲酶	催化部位
Mo	黄嘌呤氧化酶	氧化还原
V	硝酸盐还原酶	氧化还原
Se	谷胱甘肽过氧化物酶	取代活性部位中一个半胱氨酸中的 S
Mg^{2+}	许多激酶	帮助结合 ATP

4. 靠近和定向效应

上面讨论的酸碱催化和共价催化两种酶催化机制,相对于非酶反应来说,酸碱催化的影响在酶促反应中大概可以使酶反应加速 10～100 倍,共价催化也具有同样的加速作用。除了酸碱催化和共价催化之外,底物特异结合和定向于酶的活性部位(靠近和定向效应),以及酶与底物结合后使得底物变形,也是酶催化机制的一部分。

酶催化作用发生在酶的活性部位,显然活性部位处的底物浓度越高,越有利于反应。酶与底物结合有一定的方式,底物靠近活性部位的催化基团,容易形成过渡态。活性部位中结合底物的基团对底物有亲和力,能将“捕获”的底物分子定位于催化基团作用的部位。如果没有这一有效的结合,催化将取决于与底物的随机碰撞,酶与底物接触的机会少,势必要花很长时间完成催化反应。所以除了结合底物外,活性部位还将底物定向,以便使底物相对于催化基团处于最好的取向,增强酶催化作用,帮助酶结合底物和以高速率进行正确的特异反应。

4.6　米氏方程

酶促反应动力学简称酶动力学,主要研究酶促反应的速度及其他因素,例如抑制剂等对反应速度的影响。动力学研究可以给出许多与酶的特异性和酶的催化机制有关的信息。20 世纪前半叶,大多数关于酶的研究都涉及动力学实验。这些实验通过给出反应速度是如

何受到反应物浓度和实验条件变化的影响来描述酶的活性,例如作为催化剂的酶是如何起到高效催化作用的,以及酶表现出最大活性的最适条件。

早期实验获得的充分证据表明酶(enzyme,E)首先结合底物形成酶-底物复合物(ES),然后在酶活性部位裂隙中,酶与底物短暂反应后形成产物(P)。在酶促反应中,如果底物的量超过酶量,则反应速度与酶浓度成正比(图4.11)。即当底物浓度大大高于酶量时,酶浓度对反应速度的影响是酶越多,反应越快。

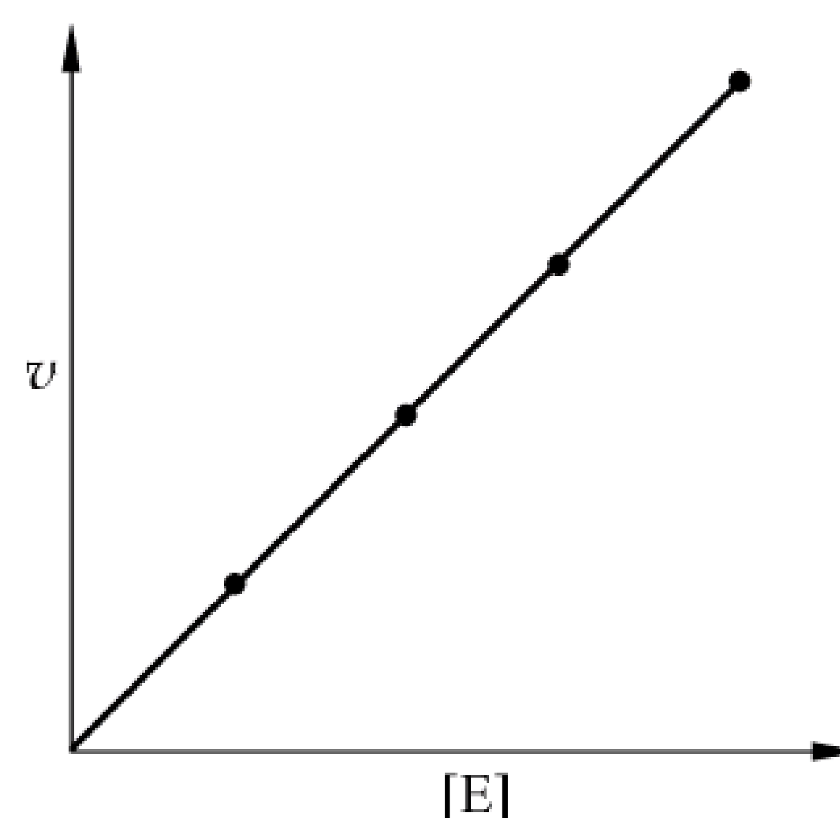
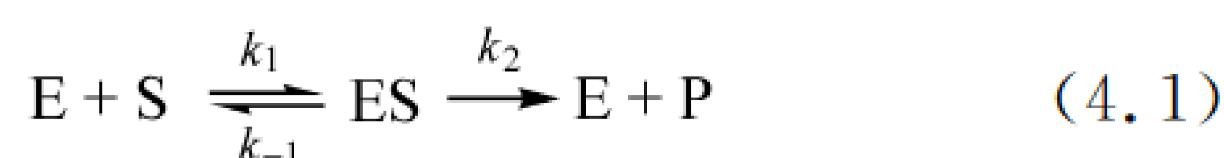


图4.11 酶浓度[E]对反应速度 v 的影响

底物大大过量

如果固定酶浓度,改变底物浓度,酶促反应的速度与底物浓度有什么样的关系呢?现在来讨论在酶(E)催化下一个底物(S)转化为一个产物(P)的简单酶促反应动力学问题。这个双分子反应起始时的反应可以写作(把酶看作一个反应分子):



$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (4.1)$$

方程中的 k_1 和 k_{-1} 是形成ES复合物(第一步反应)的正向和反向速率常数。k_2 为ES复合物生成P(第二步反应)的速率常数。由ES转换为游离的E和P的反应是用单箭头表示的。这是因为在刚开始的时候,生成的产物非常少,所以可逆反应(E+P→ES)可以忽略。此时测定的速度称为起始速度。底物转换为产物通常都是限速步骤,正是在这一步反应过程中,底物发生了化学上的变化。图4.12给出了固定酶浓度,改变底物浓度的反应速度与底物浓度的关系曲线。

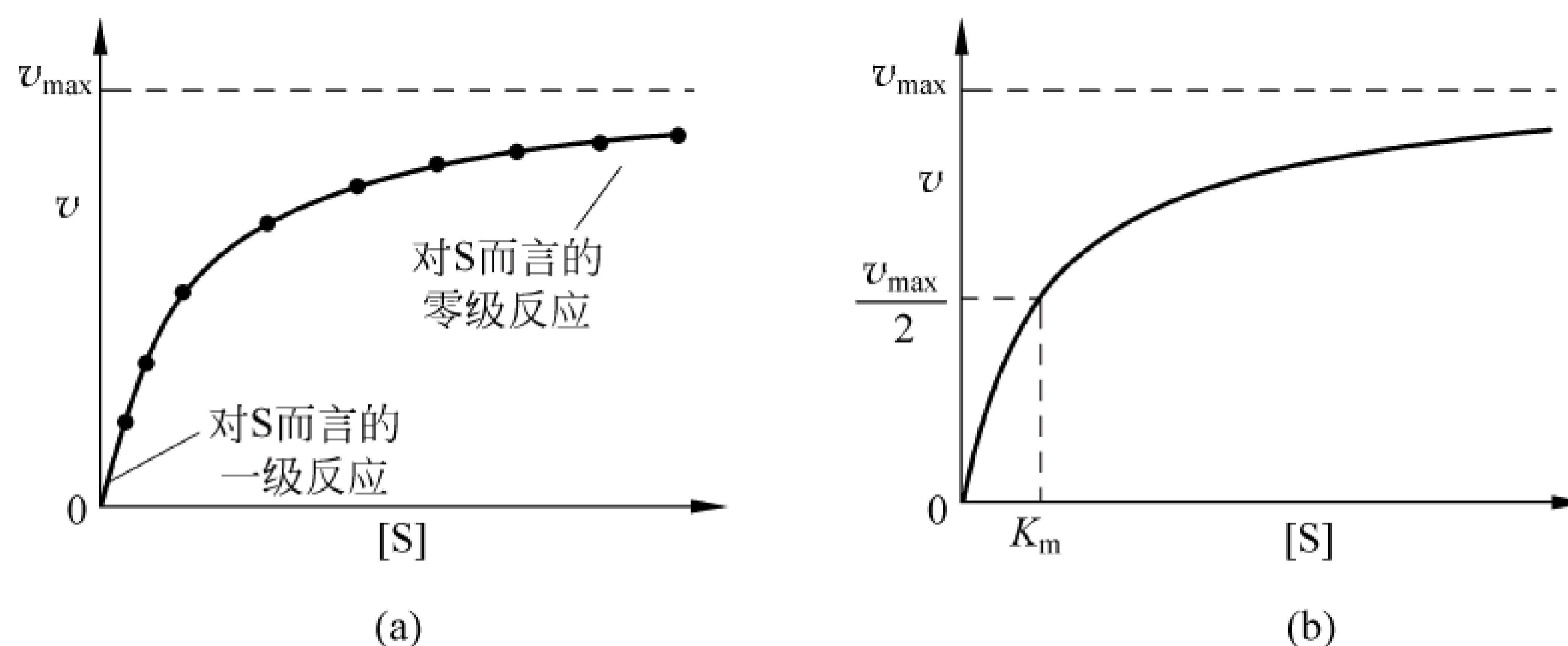


图4.12 酶促反应速度与底物浓度的关系

(a) 固定酶浓度,改变底物浓度获得的实验曲线;(b) 底物浓度增大,v_{max} 趋向一个最大值,$v_{max}/2$ 的底物浓度为 K_m

从图4.12(a)可以看出当底物浓度很高时,反应速度趋向一个最大值 v_{max},即反应速度对底物浓度不敏感。而当底物浓度很低时,反应相对于底物是一级反应(first order reaction),即反应速度与底物浓度成正比;当底物浓度处于中间范围时,相对于底物的反应是混合级反应(mixed order reaction),即当底物浓度[S]逐渐增大时,反应由一级反应向零级反应(zero order reaction)过渡,速度 v 相对于[S]的曲线为一双曲线。

当讨论一个简单的酶促反应 E+S = ES → E+P 时,双曲线方程可以写成:

$$v=\frac{v_{max}[S]}{K_m+[S]} \tag{4.2}$$

这个方程称为 Michaelis-Menten 方程，是 Michaelis 和 Menten 提出的酶动力学基本原理的一个数学表达式，其中 K_m 值称为米氏常数，v_{max} 是酶被底物饱和时的最大反应速度。

4.6.1 米氏方程的推导

有几种推导米氏方程的方法，其中最常见的是由 George E. Briggs 和 J. B. S. Haldane 提出的稳态推导方法。该方法是假定存在着一个稳态期，在此期间底物结合酶的速度与它解离的速度相同。假定[S]是一个固定值，当少量的酶与底物混合后不久，存在着一个称为稳态的周期，此时[ES]是个恒定值，因为 ES 解离为 E+S 或 E+P 的速度等于由 E+S 形成 ES 的速度。

由 E+S 形成 ES 的速度取决于游离酶的浓度，即[E]−[ES]。稳态可以用下面的数学式表示：

$$(k_{-1}+k_2)[ES]=k_1([E]-[ES])[S] \tag{4.3}$$

整理方程(4.3)，将速率常数集中在一边，并定义为米氏常数 K_m：

$$\frac{(k_{-1}+k_2)}{k_1}=K_m=\frac{([E]-[ES])[S]}{[ES]} \tag{4.4}$$

从方程(4.4)可以解出[ES]：

$$K_m[ES]=([E]-[ES])[S]$$

$$[ES](K_m+[S])=[E][S]$$

$$[ES]=\frac{[E][S]}{K_m+[S]} \tag{4.5}$$

由于酶促反应速度取决于 ES 转换为 E+P 的速度：

$$v=k_2[ES] \tag{4.6}$$

将方程(4.5)代入方程(4.6)

$$v=\frac{k_2[E][S]}{K_m+[S]} \tag{4.7}$$

因为 $k_2[E]=v_{max}$，代入方程(4.7)，就得到了米氏方程：

$$v=\frac{v_{max}[S]}{K_m+[S]} \tag{4.8}$$

当底物浓度[S]=K_m时，由米氏方程(4.8)可计算出 $v=v_{max}/2$，所以米氏常数 K_m是酶促反应速度 v 为最大酶促反应速度值一半时的底物浓度[图 4.14(b)]。

在 K_m定义的公式$(k_{-1}+k_2)/k_1$ 中，如果 k_2 比 k_1 或 k_{-1} 小得多(实际情况常常是这样)，k_2 可以忽略，K_m就变成了 k_{-1}/k_1，这是 ES 解离为 E+S 的解离常数。因此 K_m是 E 对 S 的亲和力的量度。K_m越小，表明 E 与 S 结合得越紧密。

一个酶可能作用于数个底物，但对于每一个底物都有不同的 K_m值，显然 K_m值越小表明底物与酶的亲和力越强，通常将 K_m值最小的底物称之为酶的最适底物，或天然底物。同样可能有几个酶都可以作用于同一个底物，K_m值越小的酶与该底物的亲和力更强。

在酶促反应中，经常会出现一个称为催化常数(catalytic constant，k_{cat})的术语，催化常数被定义为：$k_{cat}=v_{max}/[E]$

其中[E]是反应起始酶总浓度。催化常数也称为酶的转化数(turnover number),是 1mol 酶(或每个活性中心)单位时间催化转化成产物的底物的摩(尔)量。k_{cat} 的单位是 s^{-1}。k_{cat} 的倒数是完成一个催化过程所需要的时间,所以催化常数可以衡量一个酶促反应的快慢。而酶的催化效率常用 k_{cat}/K_m 比值来度量,许多酶的 k_{cat}/K_m 都介于 $10^7 \sim 10^8 mol^{-1}s^{-1}$ 之间。

4.6.2 双倒数作图

通过几种方法很容易测量酶促反应中的 K_m 和 v_{max} 值。例如通过固定反应中的酶浓度,然后分析几种不同底物浓度下的起始速度,就可获得 K_m 和 v_{max} 值。为了使测量的动力学常数可靠,选择的[S]的点应当分散一些,K_m 值之上和以下的[S]值都可以形成双曲线。但直接从起始速度对底物浓度的图中确定 K_m 或 v_{max} 值是很困难的,因为曲线接近 v_{max} 时是个渐进的过程。当然,利用合适的计算机程序,通过向表示双曲线的方程中代入测量的实验数值,也是可以获得精确的 K_m 和 v_{max} 值的。

在计算机广泛应用之前,通常都是利用米氏方程的转换形式求出 K_m 和 v_{max} 值。常用的是 Lineweaver-Burk 等导出的米氏方程的倒数形式,也称为双倒数方程:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

使 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图,可以获得一条直线(图 4.13)。从直线在 x 轴的截距可以得到 $1/K_m$ 的绝对值;而 $1/v_{max}$ 是直线在 y 轴的截距。虽然由双倒数作图得到的 K_m 和 v_{max} 值的精确性要比计算机计算给出的值差,但双倒数作图直观、容易理解,为酶抑制研究提供了易于识别的图形。

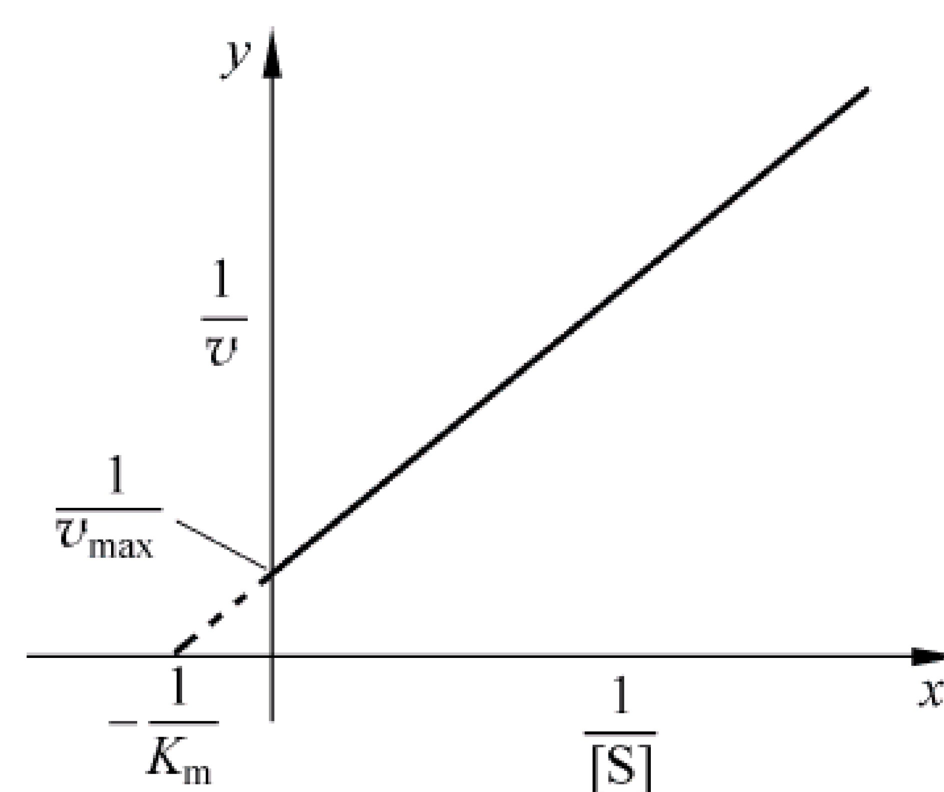


图 4.13 双倒数作图

图中虚线是由实线外推部分,并不是实验部分

4.6.3 双底物反应

上面讨论了[S]对酶促反应速度影响遵从米氏反应模式的单底物反应,实际上两个或多个底物与酶结合并生成多种产物的酶催化反应更普遍。例如后面糖酵解己糖激酶催化的反应中,就有 ATP 和葡萄糖两种底物参与,生成 ADP 和葡糖-6-磷酸两种产物:



葡萄糖+ATP ⟶ ADP+葡糖-6-磷酸

据统计,有两个底物参与并生成两种产物的反应约占生物化学反应的 60%。双底物的酶促反应速度也可以用米氏反应模式分析,通常的做法是固定其中一个底物(例如葡萄糖)的浓度(过量),而分析另一个底物(ATP)浓度变化对酶促反应速度的影响,所以酶对每一个底物都有一个 K_m,例如己糖激酶对葡萄糖的 K_m 为 0.05,而对 ATP 的 K_m 为 0.4。

双底物的酶促反应往往涉及两个底物之间的功能基团或原子的转移。由于两个底物都要结合酶进行反应,所以可根据是否形成三元复合物将双底物反应机制分为两类:顺序机制(sequential mechanism)和乒乓机制(Ping-pong mechanism)。图 4.14 给出了酶催化 A 和 B 两个底物生成 P 和 Q 两个产物的不同反应机制。



$$A + B \longrightarrow P + Q$$

顺序机制指两个底物(A 和 B)都必须先与酶结合,形成三元复合物(EAB)后才发生反

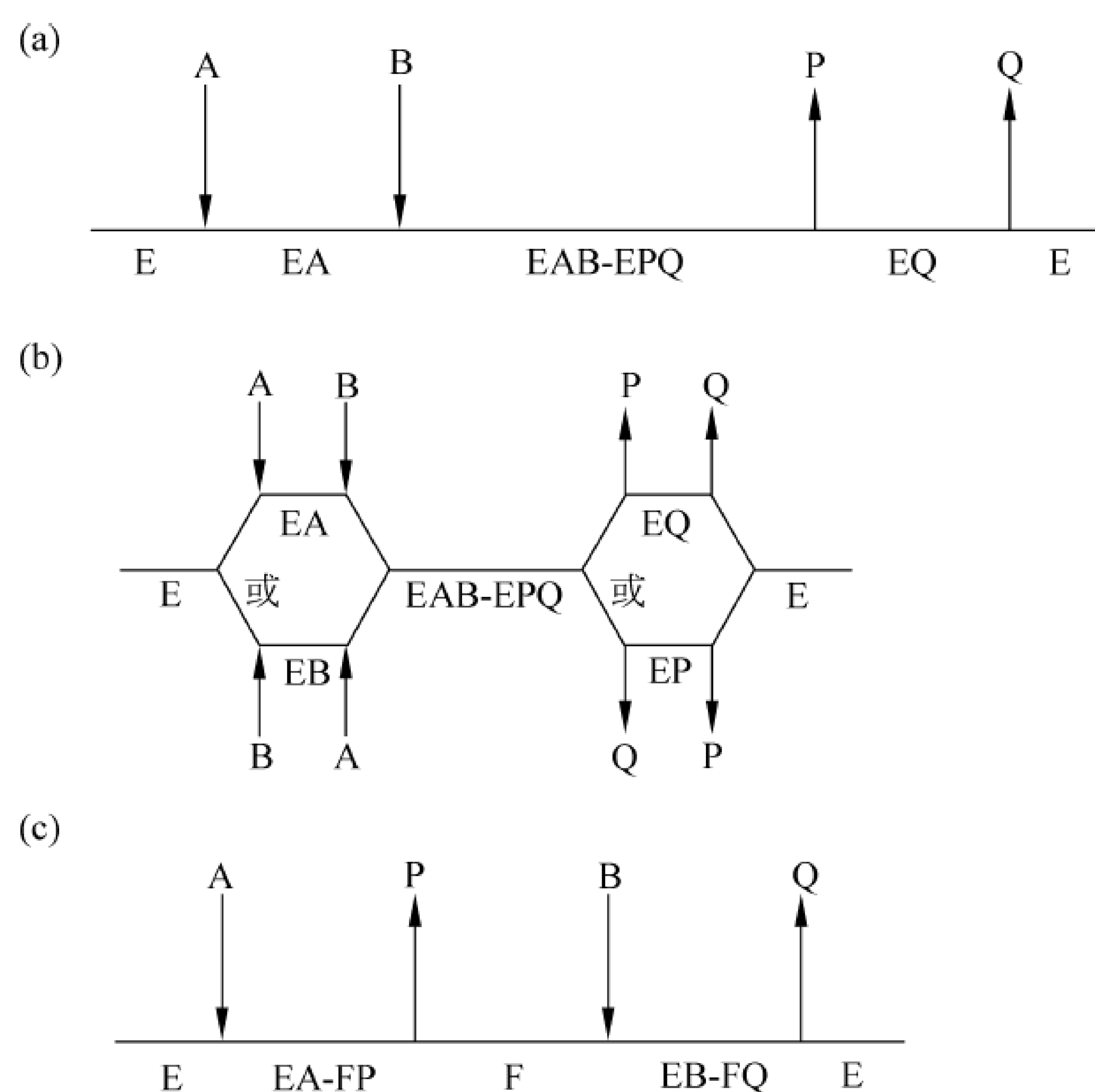


图 4.14 双底物反应机制

用一直线表示 E；(a) 有序机制，A 一定要先结合酶，A 称为先导底物，B 称为后随底物；(b) 随机机制，A 或 B 都可先与酶结合；(c) 乒乓机制，F 代表 E 结合了 A 的功能基团后的状态，F 将该功能基团转移给 B 后，恢复为 E

应。顺序机制又分为两类：有序机制(ordered mechanism)和随机机制(random mechanism)。在有序机制中，底物结合酶依强迫顺序进行，只有第一个底物(A)的结合才能促使酶形成第二个底物(B)的结合位点[图 4.14(a)]。例如依赖于辅酶 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的脱氢酶催化的反应，就遵循双底物反应有序机制，辅酶为先导底物。而在随机机制中，两个底物结合无优先顺序，游离酶上存在着两个底物的结合位点，例如激酶催化的反应[图 4.14(b)]。

乒乓机制，类似于打乒乓球，一来一往，一个底物(A)结合后发生反应转化为产物(P)释放出来，第二个底物(B)结合转化为第二个产物(Q)[图 4.14(c)]。例如转氨酶催化的氨基转移反应就遵循乒乓机制，一个氨基酸先结合酶反应后，将氨基转移给酶之后形成酮酸；然后另外一个酮酸结合酶，接收酶转给的氨基，最后生成相应氨基酸。

双底物反应机制也可以用速率方程描述，但要比单底物反应复杂得多，本书就不介绍具体的双底物反应速率方程的推导过程了。

4.7 可逆抑制作用

抑制剂(inhibitor，I)是一种与酶结合的化合物，通过防止 ES 形成或防止 ES 生成 E+P 来抑制酶的活性。实验中抑制剂常用来研究酶的作用机制和解释代谢途径。抑制作用可分为不可逆抑制和可逆抑制。不可逆抑制剂通过共价键与酶结合；可逆抑制剂通过非共价键与酶结合。由于是非共价键结合，可逆抑制剂可以通过透析或凝胶过滤从酶溶液中除去。可逆抑制作用又可分为竞争性抑制作用、反竞争性抑制作用和非竞争性抑制作用。

4.7.1 竞争性抑制作用

如图4.15(a)所示,在竞争性抑制作用中,抑制剂I只与游离的E分子结合。当I与E结合后,就阻止了S与E的结合;反之S与E的结合也阻止了I与E的结合。就是说S和I与酶的结合是竞争性的。当S和I都存在于溶液中时,酶能够形成ES的比例取决于S和I的相对浓度和酶对它们的亲和性。

通过增加S的浓度,可以使EI的形成逆转。所以,在竞争性抑制作用中,S的浓度足够大后,E仍旧可以被S饱和。因此,最大反应速度 v_{max} 与没有I存在时一样。但由于存在竞争性抑制剂,要使酶与底物的结合达到半饱和就需要更多的底物。显然竞争性抑制剂浓度增加, K_m 值也相应地增加了。

从有竞争性抑制剂存在的双倒数图可以看出,一个竞争性抑制剂的影响是使曲线在 x 轴上的截距($1/K_m$)的绝对值减小,但 y 轴上的截距($1/v_{max}$)无论I的浓度如何变化都保持不变[图4.15(b)]。

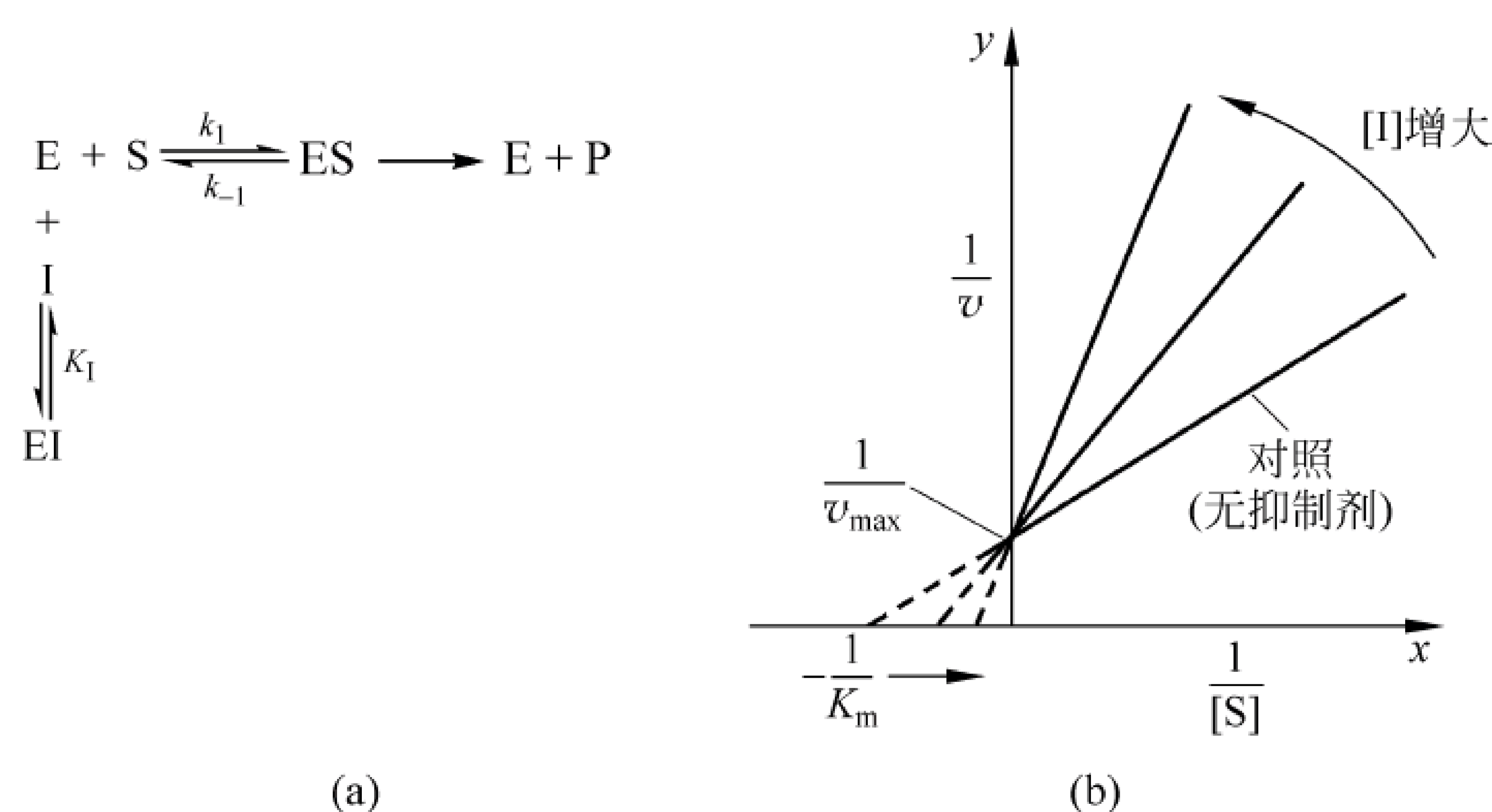


图4.15 竞争性抑制作用

(a) 竞争性抑制动力学反应式;(b) 竞争性抑制的双倒数图, v_{max} 不变,而 K_m 增大

常见的竞争性抑制剂都是底物的类似物,例如由琥珀酸脱氢酶催化的反应,琥珀酸为酶的底物,而丙二酸为琥珀酸的类似物,是酶的竞争性抑制剂(图4.16)。

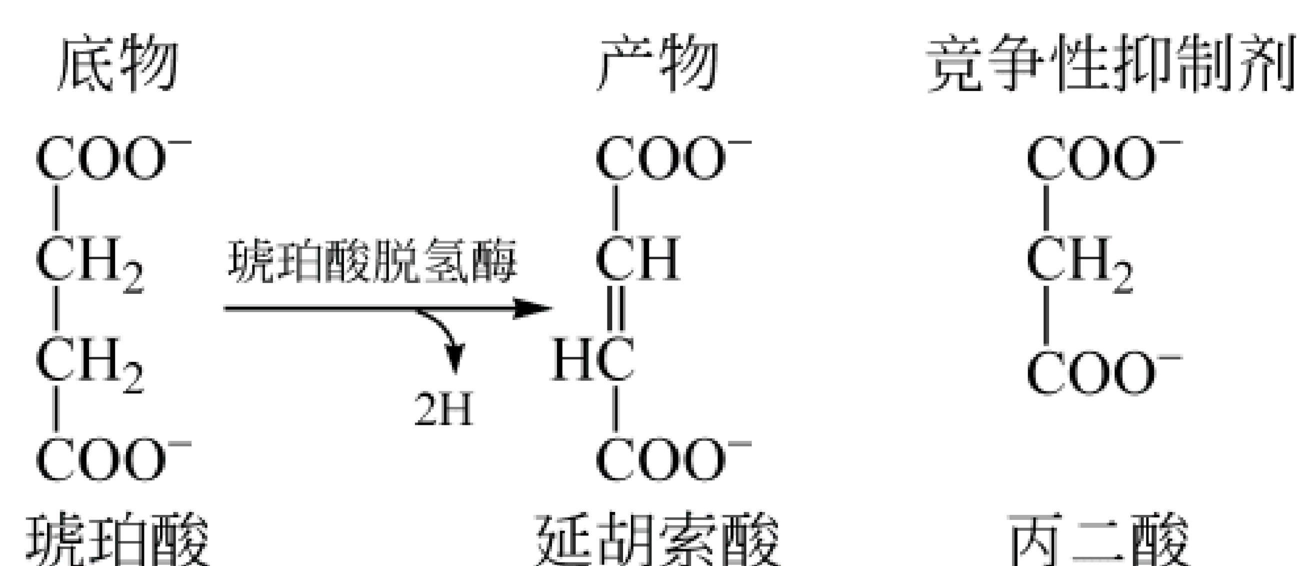


图4.16 琥珀酸脱氢酶催化的反应

底物为琥珀酸,而底物类似物丙二酸为酶的竞争性抑制剂

4.7.2 反竞争性抑制作用

在反竞争性抑制作用中[图4.17(a)],抑制剂只与ES结合,而不与游离酶结合。某些酶分子转换为非活性形式ESI, v_{max} 减小了($1/v_{max}$ 增大)。因为ES复合物结合I,所以加入

再多的底物也不能扭转 v_{max} 减小。反竞争性抑制作用也使 K_m 减小(即 $1/K_m$ 的绝对值增大),这是由于 ES 和 ESI 形成的平衡倾向于结合 I 的复合物的形成。图 4.17(b)给出了反竞争性抑制作用的双倒数图,从图中可以看出,无论反竞争性抑制剂的浓度如何变化,画出的速度直线的斜率都是一样的。这表明 K_m 和 v_{max} 值都按同样比例减小,这种抑制作用通常只出现在多底物的反应中。

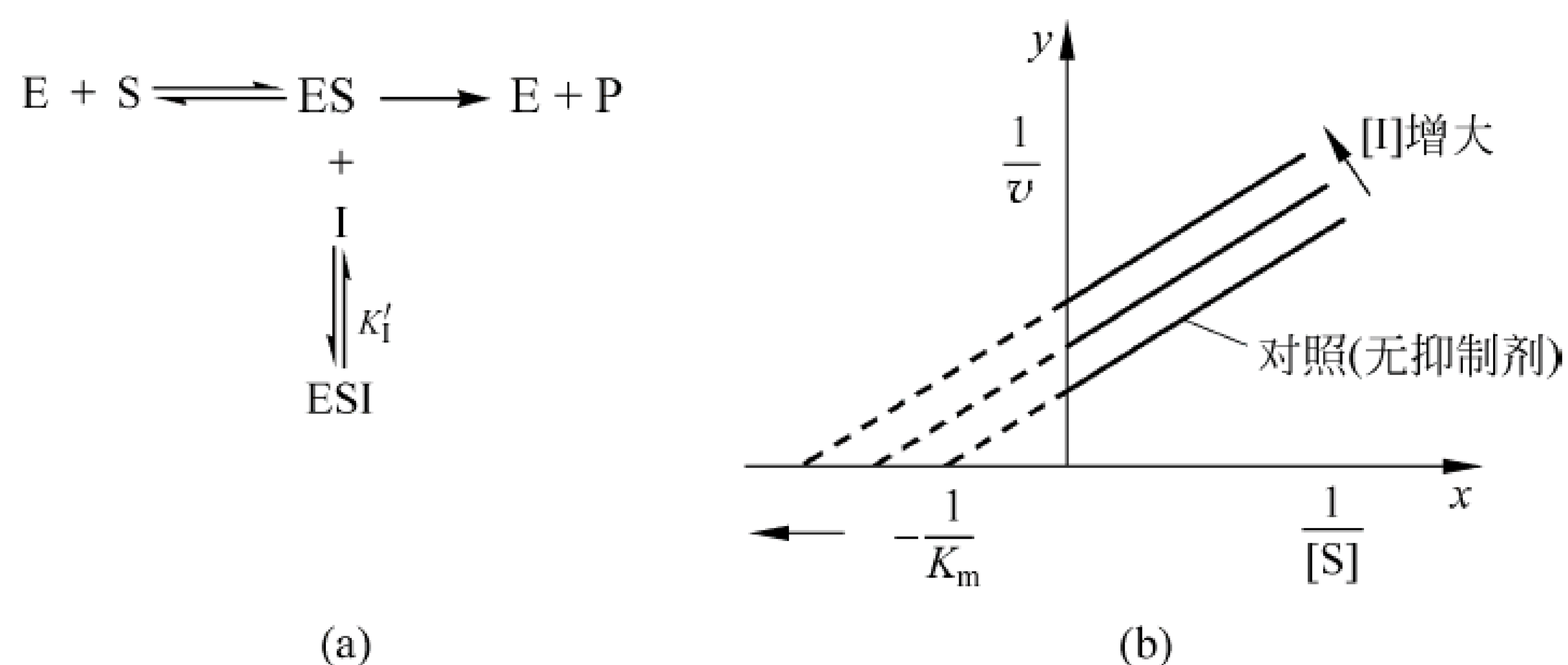


图 4.17　反竞争性抑制作用

(a) 反竞争性抑制动力学反应式;(b) 反竞争性抑制的双倒数图,v_{max} 和 K_m 都按比例减小

4.7.3　非竞争性抑制作用

非竞争性抑制剂既可与 E 结合,也可与 ES 结合,生成的 EI 和 ESI 都是失活形式的复合物[图 4.18(a)]。当非竞争性抑制剂 I 与 E 和 ES 的亲和性都一样时,此时 $K_I = K_I'$,这样的抑制作用称为纯非竞争性抑制作用。这种抑制作用的特点是 v_{max} 减小($1/v_{max}$ 增大),但 K_m 不变[图 4.18(b)]。由于非竞争性抑制剂结合在底物结合部位以外的地方,所以这种抑制作用不能通过增加底物浓度消除掉。

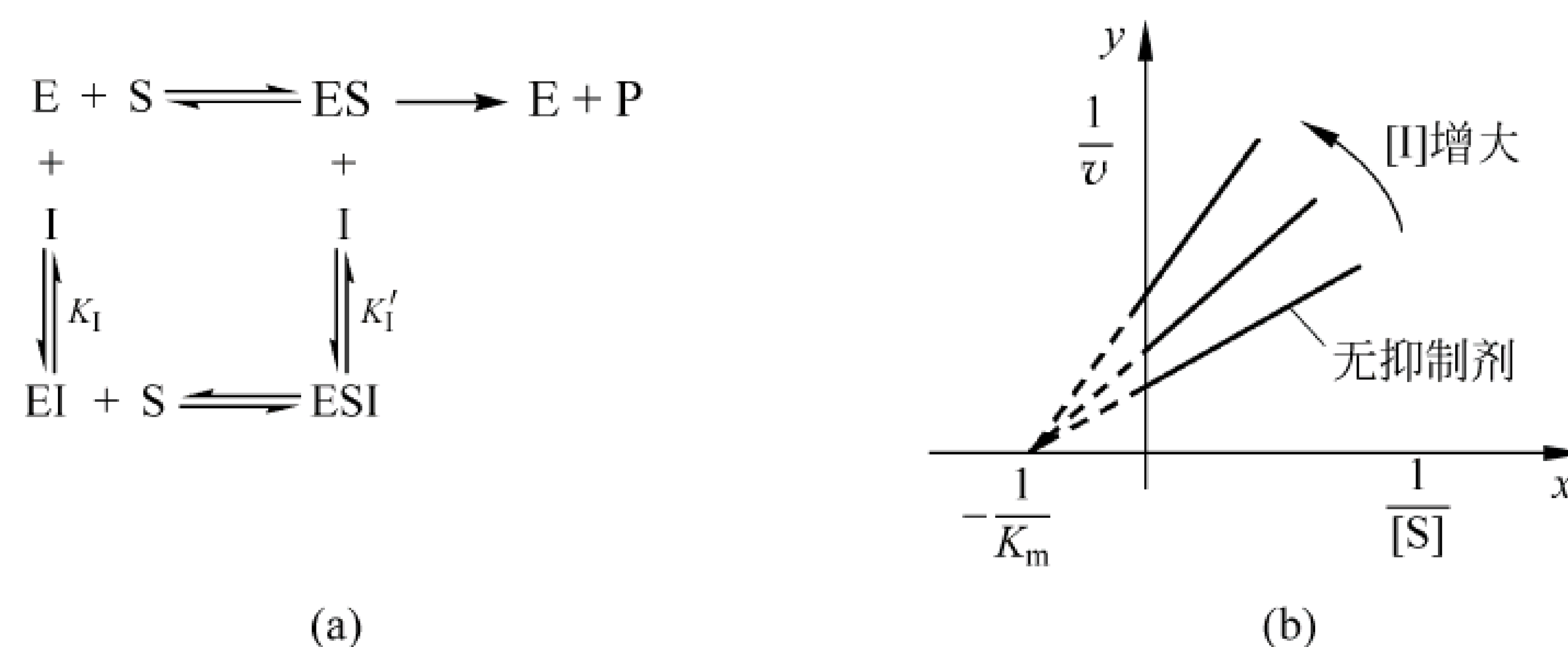


图 4.18　非竞争性抑制作用

(a) 非竞争性抑制动力学反应式;(b) 纯非竞争性抑制的双倒数图,当[I]增大时,v_{max} 减小,而 K_m 不变

当抑制剂与 E 和 ES 的亲和性不同时,即 K_I 与 K_I' 不相等时,称为混合型非竞争性抑制作用(图 4.19)。在这种抑制类型中,v_{max} 减小,当 $K_I < K_I'$ 时,K_m 增大;当 $K_I > K_I'$ 时,K_m 减小。

4.7.4　酶抑制作用的应用

可逆的酶抑制作用提供了一个可探查酶活性的有力的工具。关于一个酶活性部位的形状和化学反应性的信息可以从系统改变结构的一系列竞争性抑制剂的实验中获得。

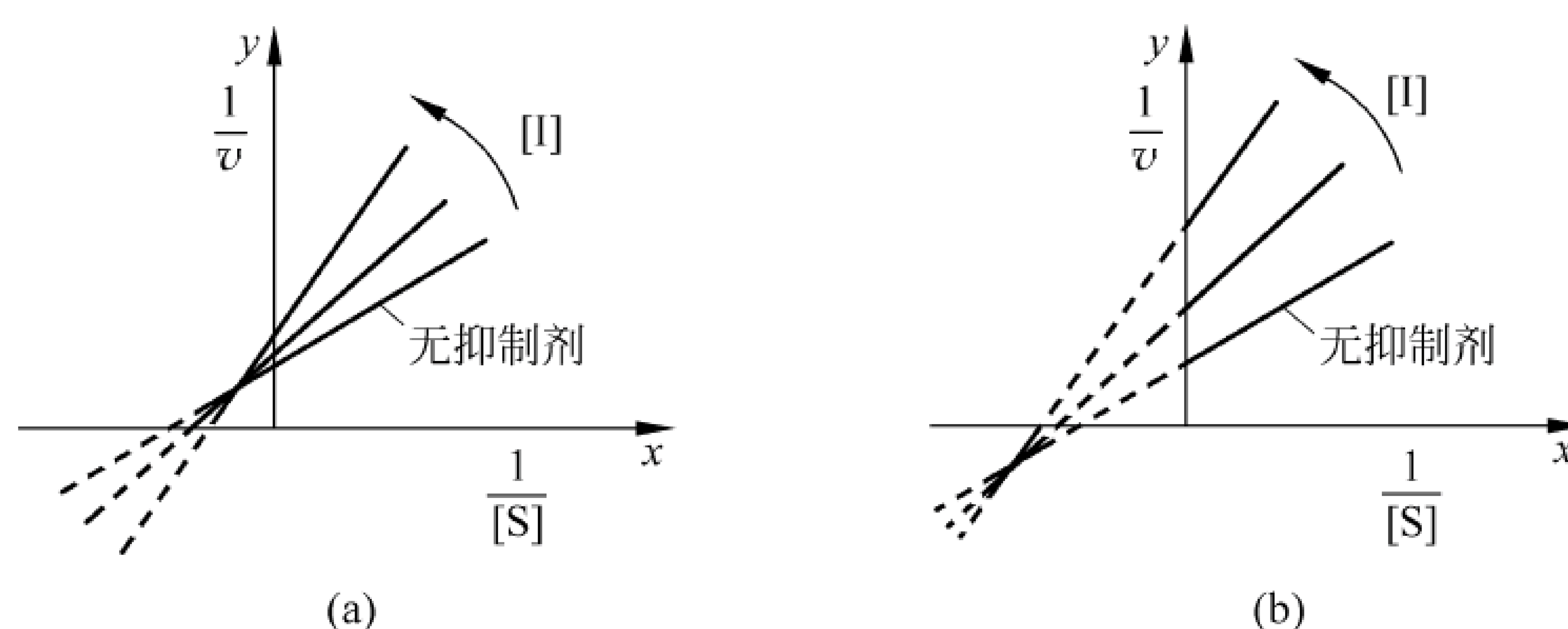


图 4.19　混合型非竞争性抑制作用

(a) $K_I < K_I'$,即 I 对 E 的亲和力比对 ES 的大时,K_m增大;(b) $K_I > K_I'$,即 I 对 E 的亲和力比对 ES 的小时,K_m减小

医药工业利用酶抑制作用研究设计应用于临床的药物。在许多情况下,天然存在的酶抑制剂被用作药物设计的起点,通过随机合成和测试去寻找强有力的抑制剂。但一些研究者转向更有效的称为推理性药物设计(rational drug design)的研究。从理论上讲,随着有关酶结构的知识库的扩大,现在根据推理可以设计出与靶酶活性部位匹配的抑制剂。一个合成的化合物的效果如何,要依次测试对分离的酶和生物系统的效果。然而,即使一个化合物具有预料的抑制活性,但可能又会遇到另外的问题,例如,药物不能进入靶细胞,可能被快速代谢为无活性化合物,药物可能对宿主机体有毒,或靶细胞可能对该药物显示出抗性。

下面以嘌呤核苷磷酸化酶的一系列抑制剂的设计为例来说明药物合成取得的进展。这个酶催化磷酸和鸟嘌呤核苷之间的降解反应,释放出鸟嘌呤[图 4.20(a)]和核糖-1-磷酸。研究人员通过计算机模拟,设计了潜在抑制剂的结构,并与酶的活性部位进行了拟合。图 4.20(b)就是一个这样合成的化合物,发现其抑制作用要比传统的试验－错误－再试验反复研究的化合物强 100 倍以上。研究人员希望推理性设计方法可以生产出一种适合于治疗类风湿关节炎和多发性硬化症等自身免疫性疾病的药物。

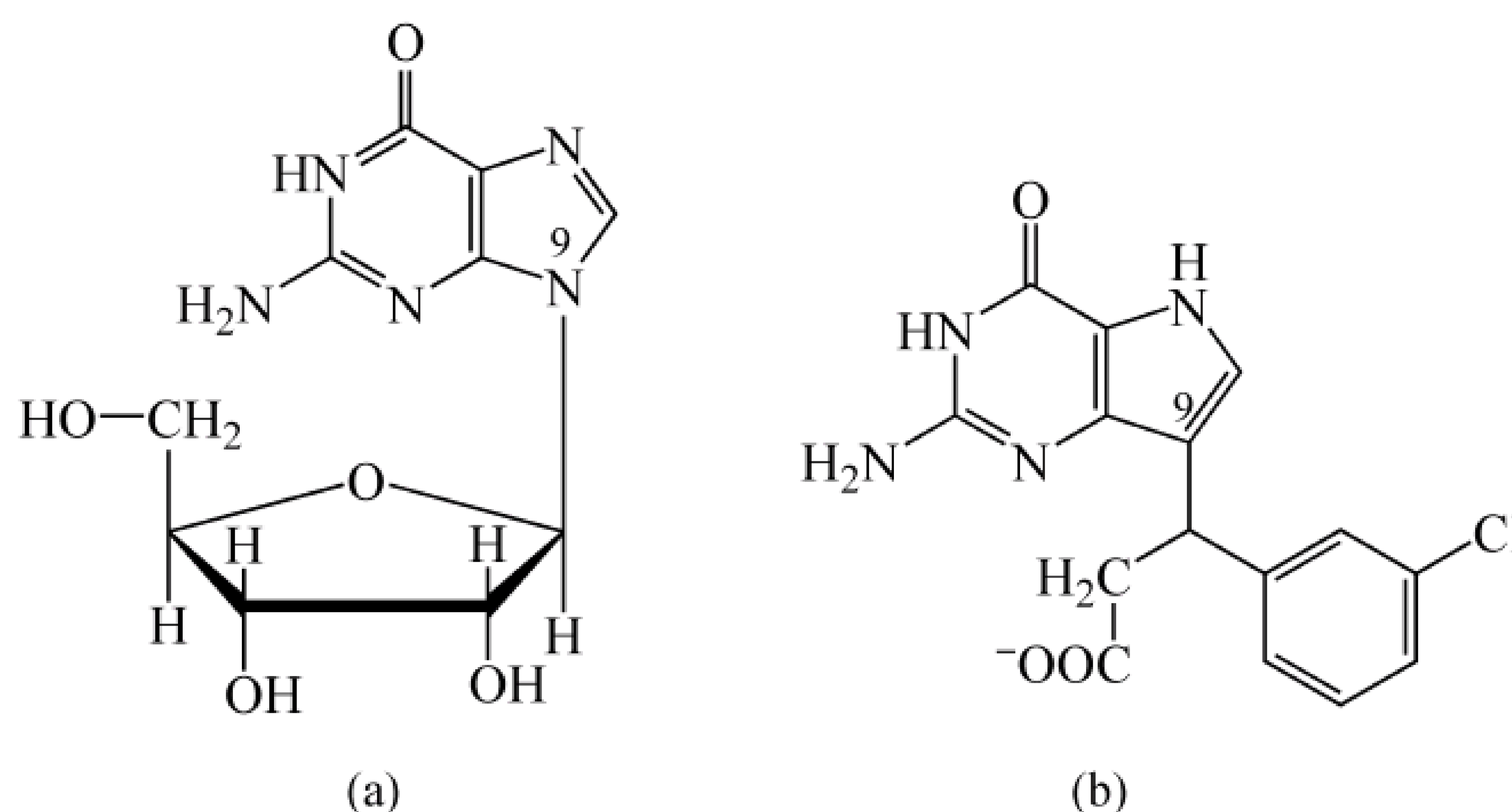


图 4.20　嘌呤核苷磷酸化酶底物与设计的抑制剂比较

酶的两个底物是鸟苷和无机磷酸。(a) 鸟苷;(b) 强有力的酶抑制剂,鸟嘌呤的 N-9 被 C 取代。氯化苯环与酶的结合糖的部位结合,而乙酸侧链与结合磷酸的部位结合

4.8　不可逆抑制作用

不可逆抑制剂通常与酶活性部位的一个氨基酸残基形成一个稳定的共价键，使酶失活，所以不可逆抑制剂也称为灭活剂(inactivator)。例如有机磷、有机汞、有机砷化合物和氰化物等都是酶的不可逆抑制剂。由于不可逆抑制剂可以使酶失活，所以在研究酶的作用机制时常用来鉴定活性部位的氨基酸残基。

有机磷化合物常见的有二异丙基氟磷酸(diisopropyl fluorophosphate，DFP)，对硫磷(parathion)、敌敌畏、美曲膦酯(敌百虫)和沙林(sarin)等农药(图 4.21)。有机磷化合物通过与酶活性部位的丝氨酸残基共价结合，使酶失活。这类农药主要作用是不可逆抑制与神经传导有关的乙酰胆碱酯酶，使乙酰胆碱不能分解为乙酸和胆碱，结果乙酰胆碱堆积引起一系列神经中毒症状。

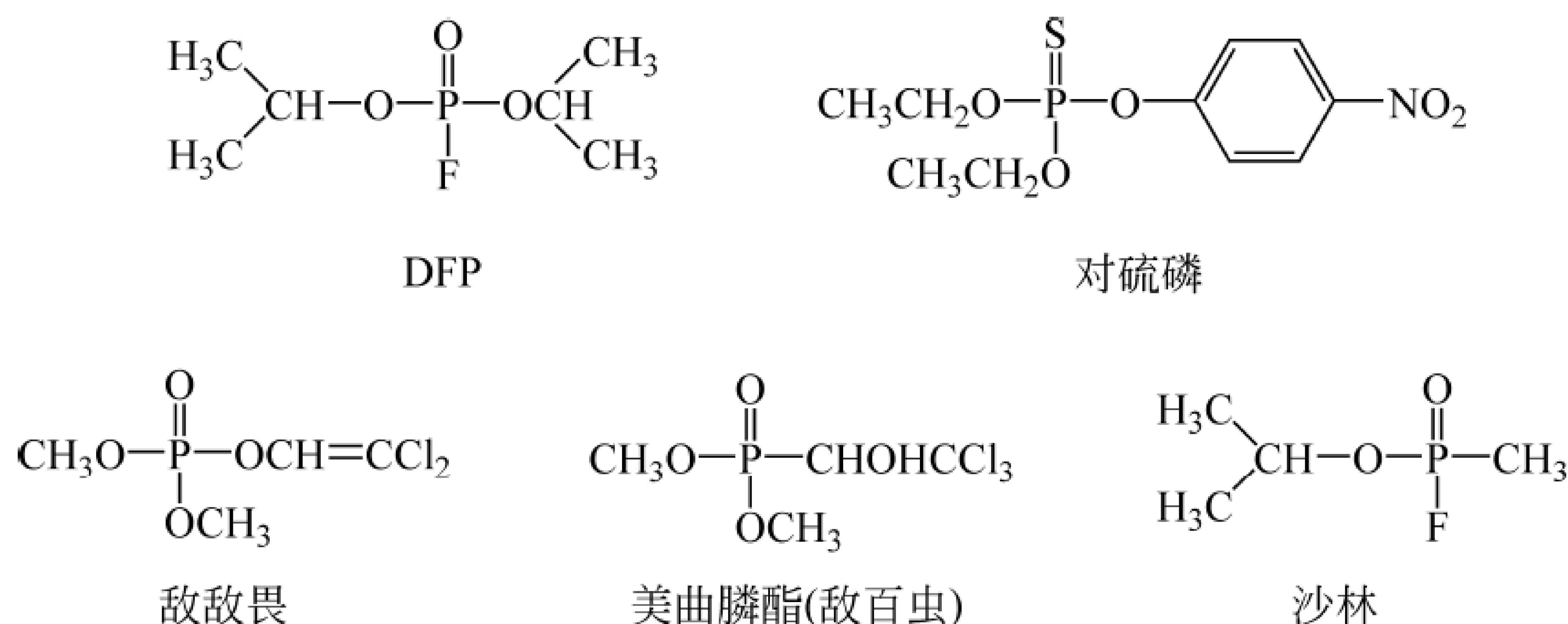


图 4.21　有机磷化合物

有机磷化合物虽然与酶共价结合，但根据已知的乙酰胆碱酯酶活性部位结构，已设计出了用于治疗有机磷化合物中毒的解毒药。碘化醛肟甲基吡啶(pyridine aldoximine methiodide，PAM)(解磷定)就是其中的一种，它可作为一种强的亲核试剂取代酶与有机磷化合物结合，从而使酶恢复活性(图 4.22)。

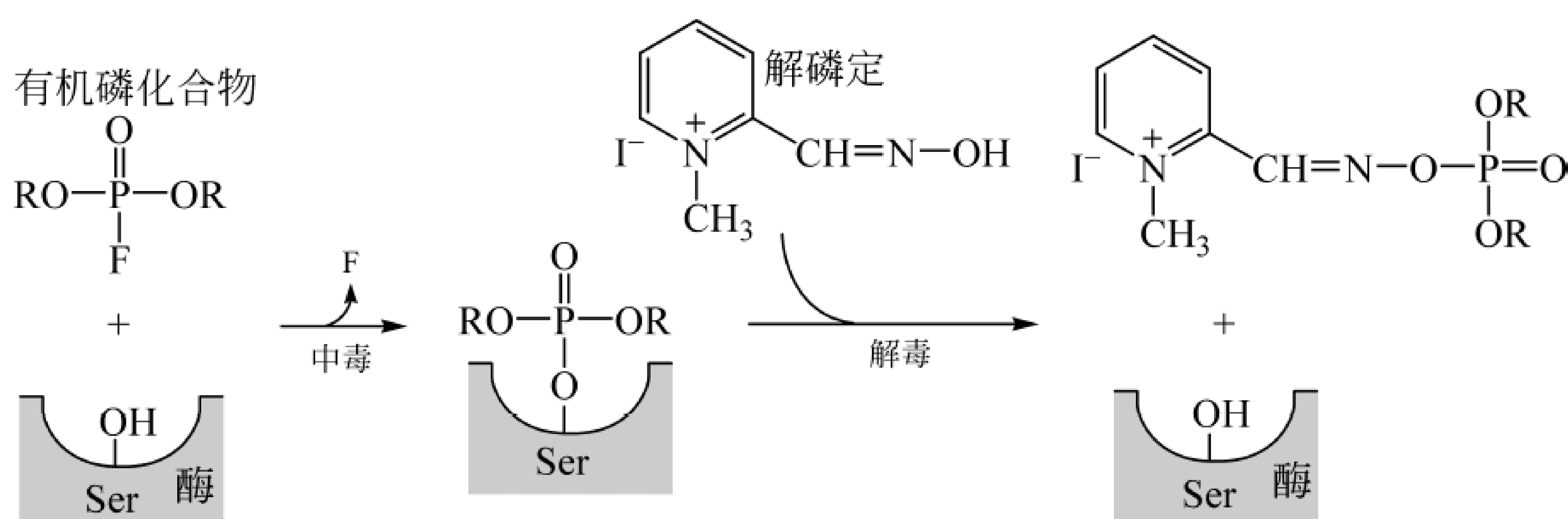


图 4.22　有机磷化合物中毒和解毒过程

4.9 pH 对酶促反应速度的影响

pH 对酶的反应速度有影响,酶只有在一定 pH 下才能表现出最大反应活性,该 pH 称为酶的最适 pH。但最适 pH 不是酶的特征常数,会受到酶的浓度、底物及缓冲液的种类等因素的影响。在不使酶变性的 pH 条件下,以反应初速度对 pH 作图,大多数情况下可得到一个近似钟形的曲线。但也有的酶的 pH 曲线不是钟形,例如胃蛋白酶,它的 pH 曲线是个偏向酸性区的半钟形曲线(图 4.23)。

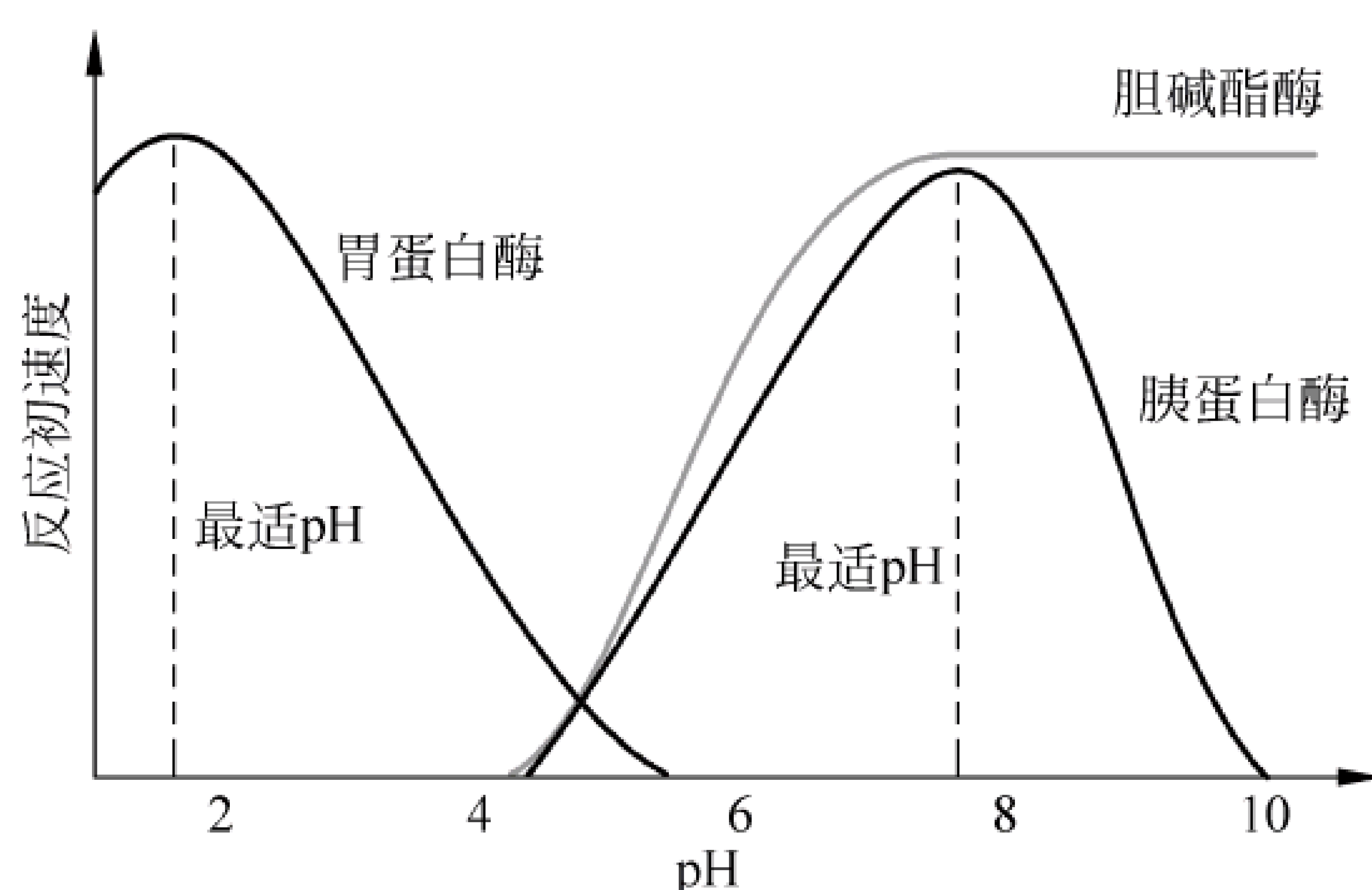


图 4.23 酶促反应初速度-pH 曲线

胃蛋白酶的最适 pH 在 1.5 左右;而胰蛋白酶的最适 pH 在 pH7.8 左右;胆碱酯酶的最适 pH 为大于 7 以上的碱性区

酶活性受到 pH 影响也不难理解,因为处于酶活性部位的氨基酸残基的侧链都是以弱酸或弱碱形式存在的,但参与酶催化时只有在特定 pH 下才能呈现出所需要的离子状态。当然非活性部位的氨基酸残基侧链在一定 pH 下的解离状态也会通过影响酶的构象来影响酶的活性。

如果以反应速度对温度作图,多数来自哺乳动物的酶的反应速度-温度曲线也像酶的反应初速度—pH 曲线那样是个钟形曲线。酶表现出最高活性(酶促反应速度最大)时的温度称为酶的最适温度。哺乳动物中酶的最适温度大都在 35～40℃。酶的最适温度和最适 pH 一样,也不是酶的特征常数。

4.10 酶的调节

酶活性受到各种因素的影响,其中一些因素对代谢的协调是必要的。在一给定时间内,有两种更显著调节酶活性的方式:①增加或减少酶分子的数目;②提高或降低每个酶分子的活性。

一个细胞合成的酶量由转录调节确定,如果一个编码特定酶蛋白的基因打开或关闭,酶量不久也会随之而变。但基因调节整个酶水平的响应时间范围从数分钟(细菌)至数小时(高等生物)。这方面的调节机制将在转录和蛋白质合成中描述。酶分子活性可以通过酶结构改变影响它对底物亲和性直接加以调控,本节将首先从酶原的激活和同工酶调节开始,然后转向酶的别构调节和共价修饰调节。

4.10.1 酶原的激活

很多蛋白水解酶，例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶由于活性部位中都含有丝氨酸残基而称为丝氨酸蛋白酶(serine protease)家族。蛋白水解酶都是在细胞内合成的，但其催化作用是在细胞外进行的。人们很自然地就提出一个问题，合成的丝氨酸蛋白酶会不会水解合成部位细胞中的其他蛋白质呢？细胞通过一个简单的不可逆的调节作用解决了这一问题，即细胞合成的是蛋白酶的非活性前体——酶原(zymogen)，这些酶原必须经过共价修饰才能具有活性，就是说要进入到消化道经修饰后才具有活性。

1. 消化道蛋白酶酶原的激活

用来水解饮食中蛋白质的消化道蛋白酶是在胃和胰腺中以酶原形式合成的。这些酶原只有经蛋白酶解激活作用才能形成具有催化活性的底物结合部位。这一激活作用对这些蛋白酶的活性是个有效的调控。下面以胰凝乳蛋白酶原为例说明酶原激活的过程。胰凝乳蛋白酶原是一个含有 245 个氨基酸残基，由 5 个二硫键交联的多肽链(图 4.24)。

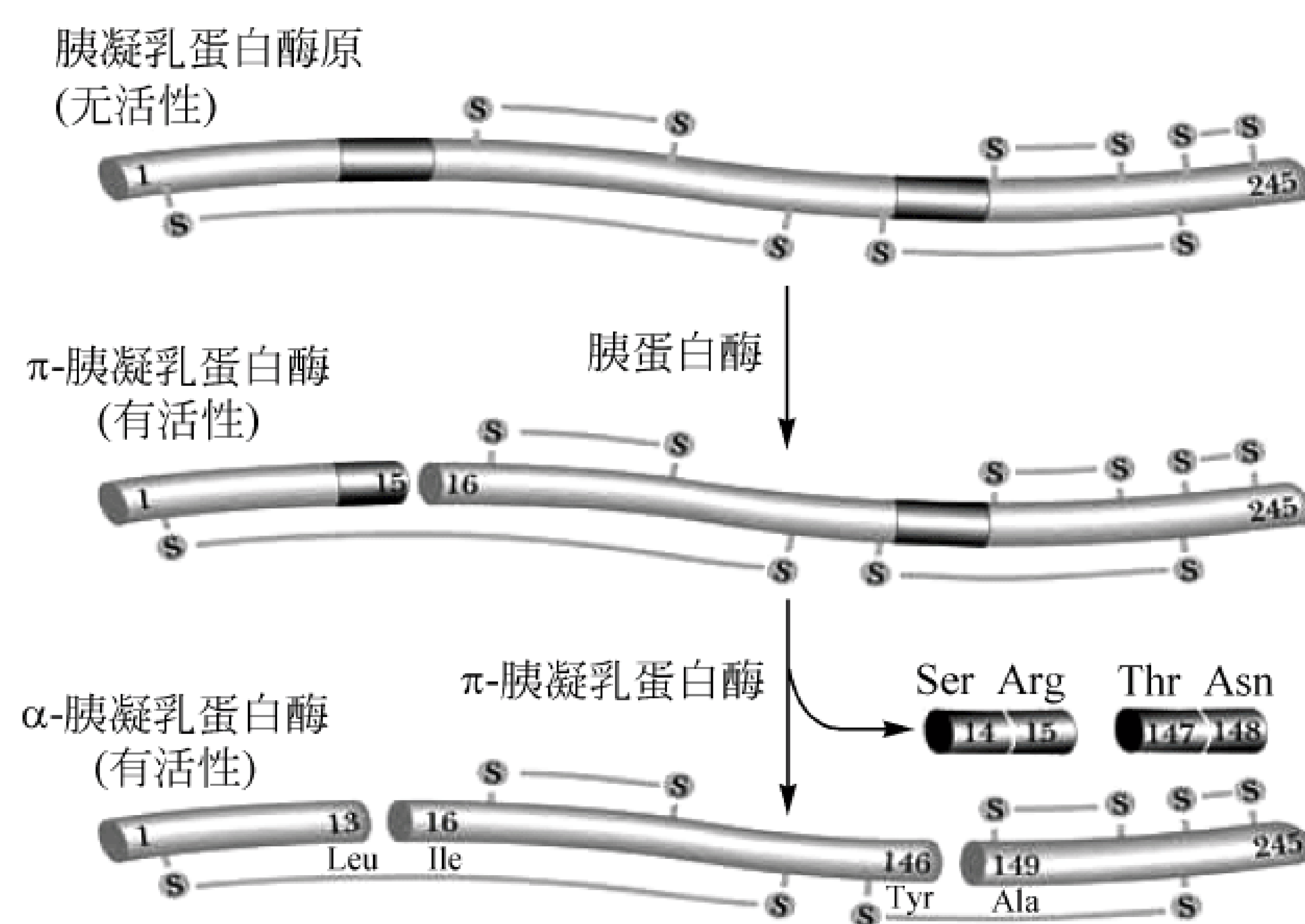


图 4.24 胰凝乳蛋白酶原的激活过程

首先在胰蛋白酶催化下，酶原 Arg-15 和 Ile-16 之间的肽键被切断，生成一个具有活性的 π-胰凝乳蛋白酶。然后这个有活性的蛋白酶作用于其他 π-胰凝乳蛋白酶分子，切下 Ser-14—Arg-15 和 Thr-147—Asn-148 两个二肽后生成成熟的蛋白酶 α-胰凝乳蛋白酶。

与胰凝乳蛋白酶原激活类似，胰蛋白酶原的激活发生在由胰腺进入十二指肠时，经肠肽酶(enteropeptidase)催化切断胰蛋白酶原中的 Lys-15 和 Ile-16 之间的肽键，并切除 N 末端的六肽后生成有活性的胰蛋白酶。胰蛋白酶原也可由肠肽酶催化生成的少量胰蛋白酶激活，即自催化完成。同样的原理，弹性蛋白酶原也可经胰蛋白酶从 N 末端切除短肽而被激活。

如果酶原过早激活，例如胰腺中蛋白水解酶原等过早激活就会破坏胰腺本身及它的血管，导致非常疼痛、且可致命的急性胰腺炎。

胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶 3 种丝氨酸蛋白酶不仅激活方式类似，活性部位结构也很类似，都含有一个结合底物的“口袋”。不过底物结合部位的微小差异却反映出了它们的底物特异性。胰蛋白酶口袋底部带有一个侧链带负电荷的 Asp，使得酶可结合底物

中带正电荷的Arg和Lys残基侧链。带有疏水口袋的胰凝乳蛋白酶可结合疏水性芳香族Phe、Tyr和Trp的侧链。弹性蛋白酶中Val和Thr残基处于结合部位,该部位只形成一个浅口袋,所以酶也只能结合像Gly和Ala那样带有小侧链的氨基酸残基(图4.25)。

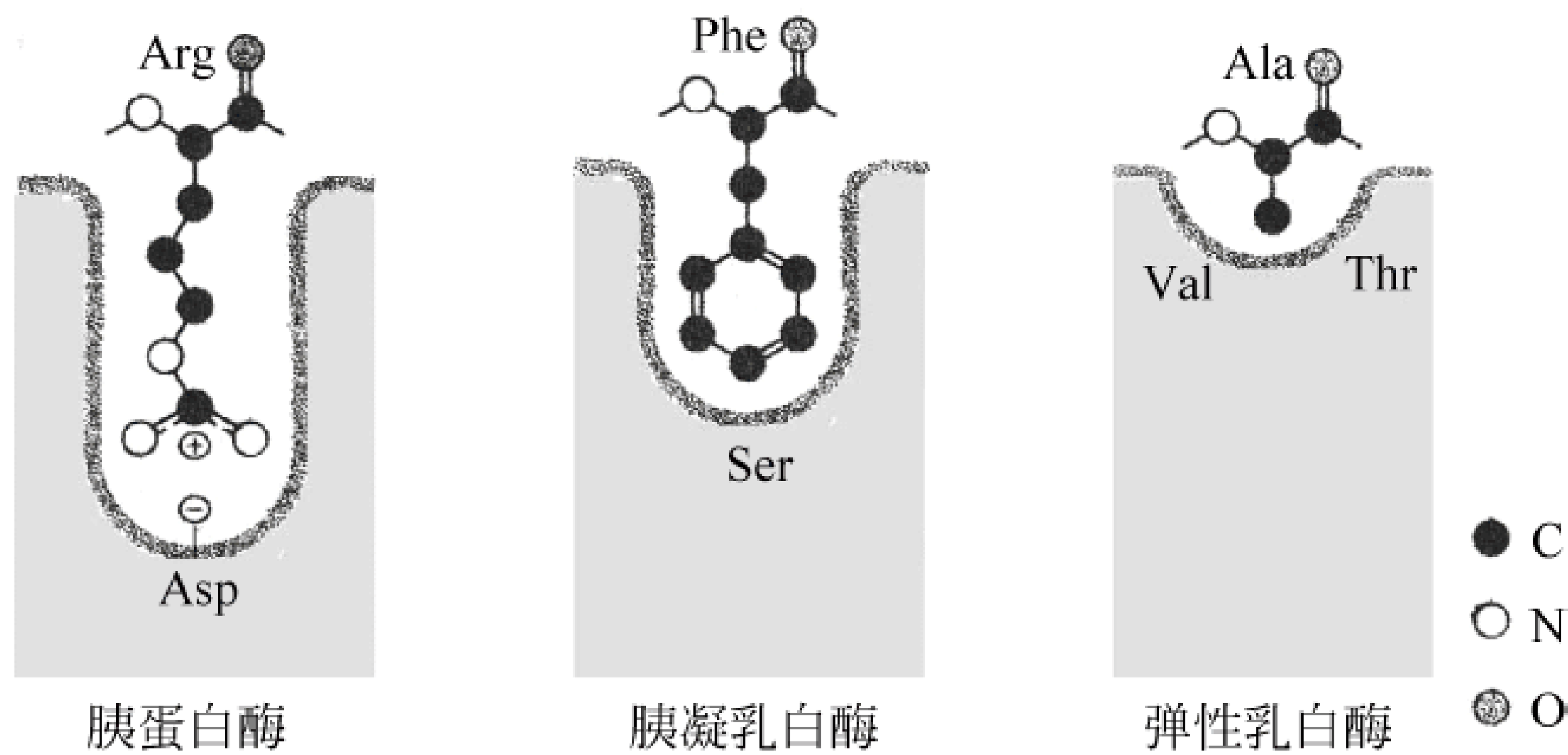


图4.25　三种丝氨酸蛋白酶的底物结合部位

相关话题　加酶洗衣粉

顾名思义,加酶洗衣粉就是原有洗衣粉中添加了生物酶。市场销售的大多数(75%)洗衣粉都含有蛋白酶,蛋白酶可有效清除脏衣服上顽固的蛋白污渍。所有蛋白酶添加物都是以丝氨酸蛋白酶为基础做成的,这些酶都是从各种各样的芽孢杆菌分离出来的。为了使处于高温条件下的洗衣粉溶液保持活性,对这些酶都进行了广泛修饰。

一个定点突变的成功范例是来自枯草杆菌的丝氨酸蛋白酶——枯草杆菌蛋白酶的氨基酸替换,结果使得酶更抗化学氧化。原来这个酶在活性部位裂隙中有一个蛋氨酸残基(Met-222),这个残基容易被氧化而导致酶失活。提高抗氧化可使枯草杆菌蛋白酶更适合作为洗衣粉的添加剂。

在一系列突变实验中用每一个其他标准氨基酸去替代Met-222,并对所有19个可能的突变枯草杆菌蛋白酶都进行了分离和测试,大多数突变都使肽酶活性大大降低。虽然Cys-222突变体具有高活性,也易受氧化。但Ala-222和Ser-222突变体(都没有可氧化侧链)不能被氧化失活,而且有比较高的活性。它们是仅有的有活性、抗氧化的突变体枯草杆菌蛋白酶变异体。

定点突变已将细菌蛋白酶的319个氨基酸残基中的8个都进行了替换。野生型蛋白酶在加热时较比稳定,但适当突变的酶在100℃时稳定且功能依旧。通过例如二硫键那样的官能团可防止洗衣粉中蛋白变性,稳定它的构象。

2. 血液凝固

血液凝固也是一系列酶原激活作用的结果。通过这些酶激活作用获得的放大作用使得响应受伤后的血液凝固进行得特别快。处于活性形式的7种凝血因子都是丝氨酸蛋白酶:激肽释放酶(kallikrein)、$Ⅻ_a$、$Ⅺ_a$、$Ⅸ_a$、$Ⅶ_a$、$Ⅹ_a$和凝血酶(thrombin)。血块形成途径分为内在途径和外在途径(图4.26)。当血液进入到受伤引起的创面时启动内在途径,而外在途径

是由受伤组织释放的凝血因子启动的。两个途径在因子Ⅹ合并，直至血块形成后终止。凝血酶将血纤蛋白原中富含负电荷的肽切除，把它转变血纤蛋白，血纤蛋白是一个具有不同表面电荷分布的分子。血纤蛋白很容易集结形成通过共价交联稳定的纤维网络。凝血酶特异切断 Arg-Gly 肽键，而且与胰蛋白酶同源，也是一种丝氨酸蛋白酶。

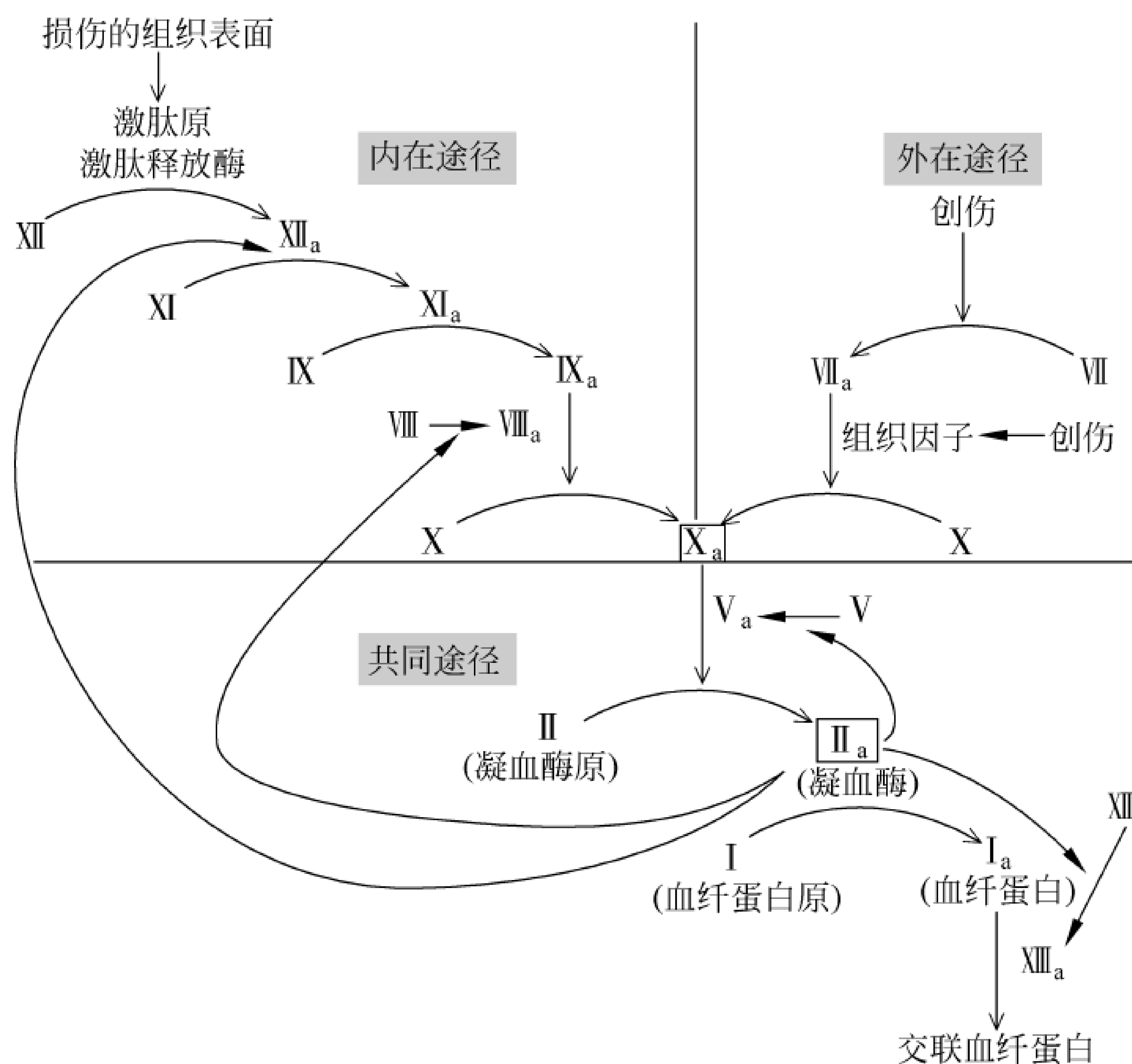


图 4.26 哺乳动物的凝血酶级联反应系统

凝血因子用罗马数字表示，数字大小大致表示发现的先后次序，脚标 a 特指有活性的凝血因子

血友病(hemophilia)是一种遗传病，该病的特征是身体受到创伤时会导致异常出血，常常是血流不止，究其原因就是血液凝固机制出了问题。常见的血友病 A 缺少凝血因子Ⅷ，Ⅷ也是激活Ⅹ的一个因子，缺少该因子使得凝血时间延长。另外，一种较少见的血友病 B 是由于缺少凝血因子Ⅺ造成的。

4.10.2 同工酶

催化相同反应，但它们的氨基酸序列、底物亲和力、V_{max}和/或调节特性不同的两种或多种形式的蛋白质称为同工酶(isozyme)。这些同工酶大都由两种被不同基因编码的亚基组成，例如哺乳动物乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)的 M(骨骼肌型)和 H(心肌型)亚基。M 和 H 组成 5 种不同的同工酶 M_4、M_3H、M_2H_2、MH_3 和 H_4(图 4.27)。根据对不同底物的相对亲和力和对产物抑制的敏感性不同，不同 LDH 的动力学特性也不同。不同组织表达不同形式的同工酶，以适应它们的特别代谢需要。通过调节合成的 M 和 H 亚基的量，不同组织的细胞控制哪个形式的同工酶能组装，哪个的动力学参数更胜一筹。这是一种有别于酶原激活的另一种酶活性的调节方式。

在厌氧条件组织，例如骨骼肌和肝中主要为 M_4H 和 M_3，而好氧组织心和肾中 H_4 和 H_3M 为主。运动的骨骼肌处于缺氧状态，由葡萄糖经糖酵解生成丙酮酸，然后需要对丙酮

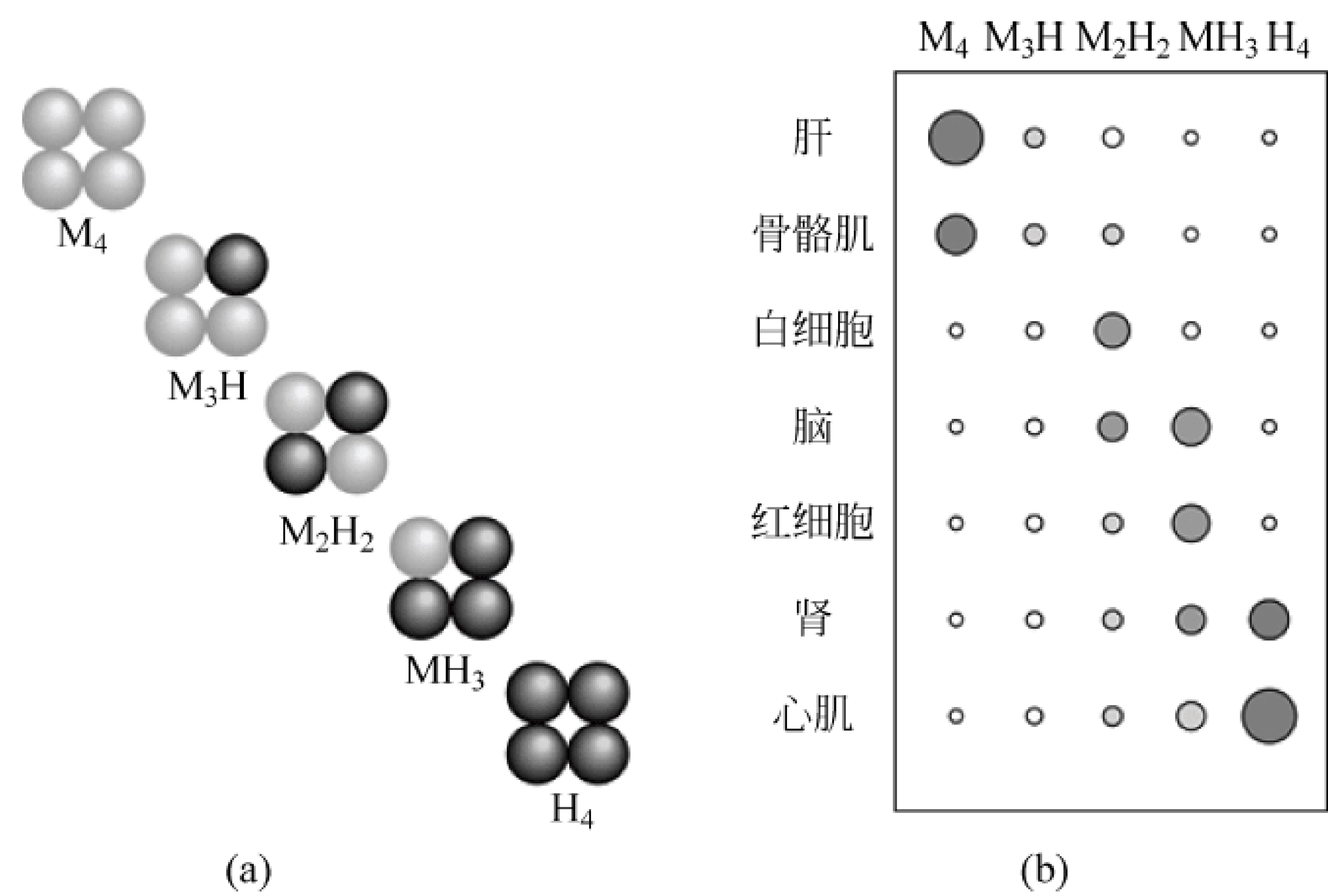


图 4.27 乳酸脱氢酶同工酶

(a) 5 种乳酸脱氢酶同工酶；(b) 5 种同工酶在各个组织中的分布图

酸亲和力高的 M_4 将它转为乳酸的同时由 NADH 生成 NAD^+，以使糖酵解继续进行。而心肌为有氧代谢，需要对乳酸亲和力高的 H_4 催化逆反应，以生成的丙酮酸作为燃料经柠檬酸循环获得能量。过量丙酮酸抑制生成乳酸的逆反应以保证燃料不能被浪费。

4.10.3 别构调节和共价修饰调节

前面讲到的酶原激活实际上是酶活性调节的一种方式，除此之外还经常会遇到两种酶活性调节方式：别构调节(allosteric regulation)和共价修饰调节(covalent modification regulation)。

1. 别构调节

在前面血红蛋白氧合曲线一节中提到了别构作用，别构作用指的是一个配体与蛋白的一个部位的结合影响另一个配体与该蛋白另一个部位结合的现象。像血红蛋白那样具有别构作用的蛋白质也称为别构蛋白(allosteric protein)。具有别构作用的酶称为别构酶(allosteric enzyme)。别构酶的动力学曲线类似于血红蛋白的氧合曲线，为S形。与别构酶结合，并调节酶活性的配体(或效应物)常称为别构效应剂(allosteric effector)或别构调节剂(allosteric modulator)。由于别构效应剂结合，通过别构作用调节酶活性的方式称为别构调节(allosteric regulation)。

通过酶动力学和物理特性的研究，别构酶都具有如下一些共同特征。

(1) 别构酶的活性对代谢的抑制剂和激活剂很敏感。这些别构效应剂一般与酶的底物或产物都不相同，而且结合在催化部位以外的调节部位。

(2) 别构效应剂与它们调节的酶非共价结合。许多效应剂改变了酶对底物的 K_m 值，而有些效应剂改变 v_{max}。酶不会引起别构效应剂本身的化学变化。

(3) 大多数别构酶都是多亚基蛋白质，亚基可相同或不同。具有相同亚基的别构酶的每一条多肽链既含有催化部位，又含有调节部位，所以这样的寡聚体是一个简单的对称的复合物，通常是二聚体或四聚体。由不同亚基组成的别构酶是更复杂的复合物，但仍然是对称的聚合物。

(4) 通常一个别构酶至少有一个底物，酶反应速度对该底物浓度的曲线是S形，而不是双曲线形。

别构酶往往催化代谢途径中的关键反应，通过调节该酶来调控整个代谢途径中反应物的流向。来自 *E. coli* 的天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)是个研究得比较透彻的别构酶。在 *E. coli* 中 ATCase 催化嘧啶核苷酸生物合成的一个关键反应：由氨甲酰磷酸和天冬氨酸生成氨甲酰天冬氨酸(图 4.28)。

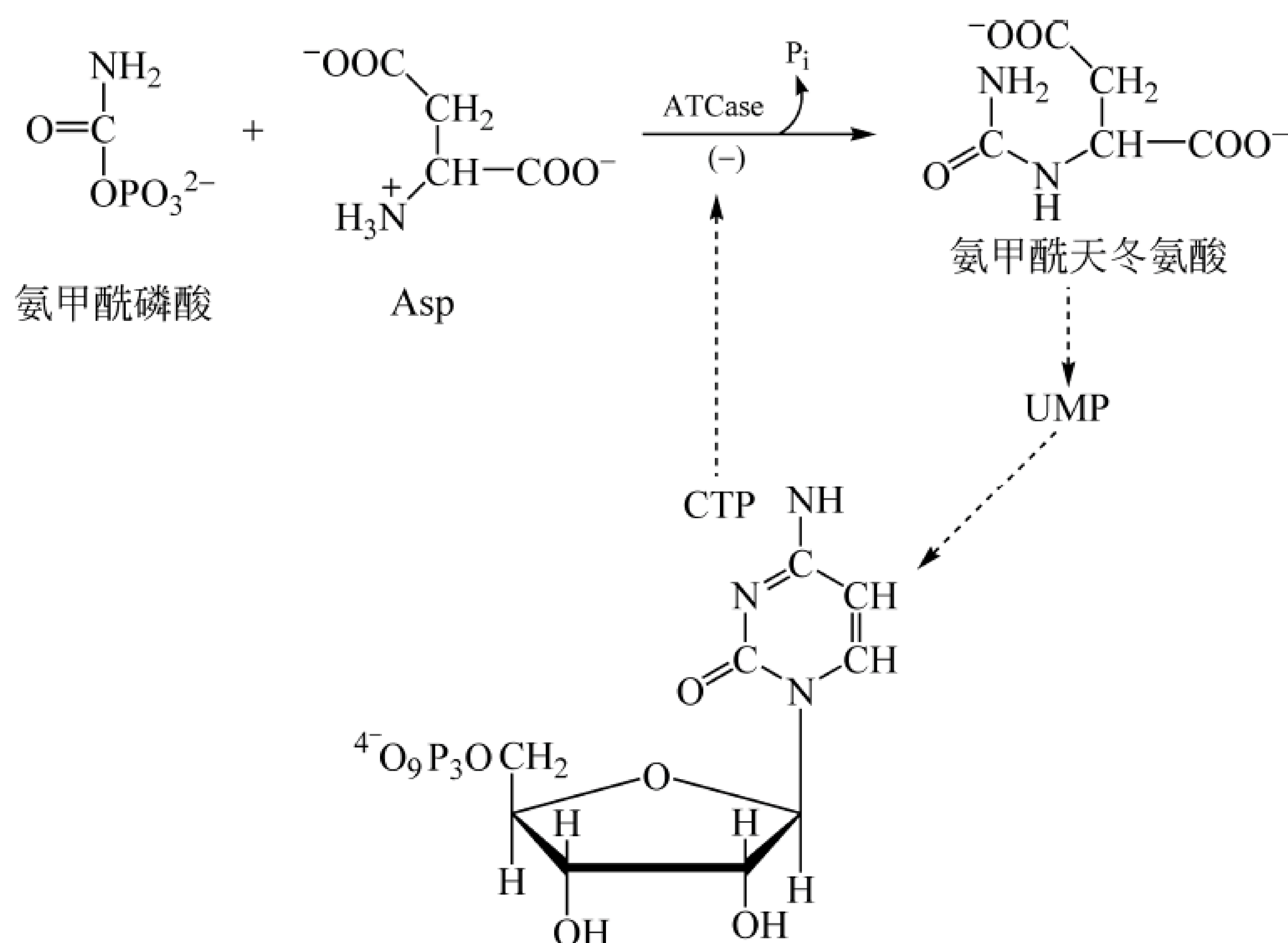


图 4.28　天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)催化的反应

首先合成尿苷酸(UMP)，然后合成尿苷三磷酸(UTP)，再由 UTP 合成胞苷三磷酸(CTP)。CTP 抑制 ATCase

研究发现胞苷三磷酸(CTP)是 ATCase 的一个别构抑制剂，也称为反馈抑制剂，而 ATP 是酶的激活剂，CTP 和 ATP 都影响底物天冬氨酸与酶的结合。图 4.29 给出了 ATCase 反应速度 v 对[Asp]的曲线，以及另外分别再加有 CTP、ATP 的反应曲线。

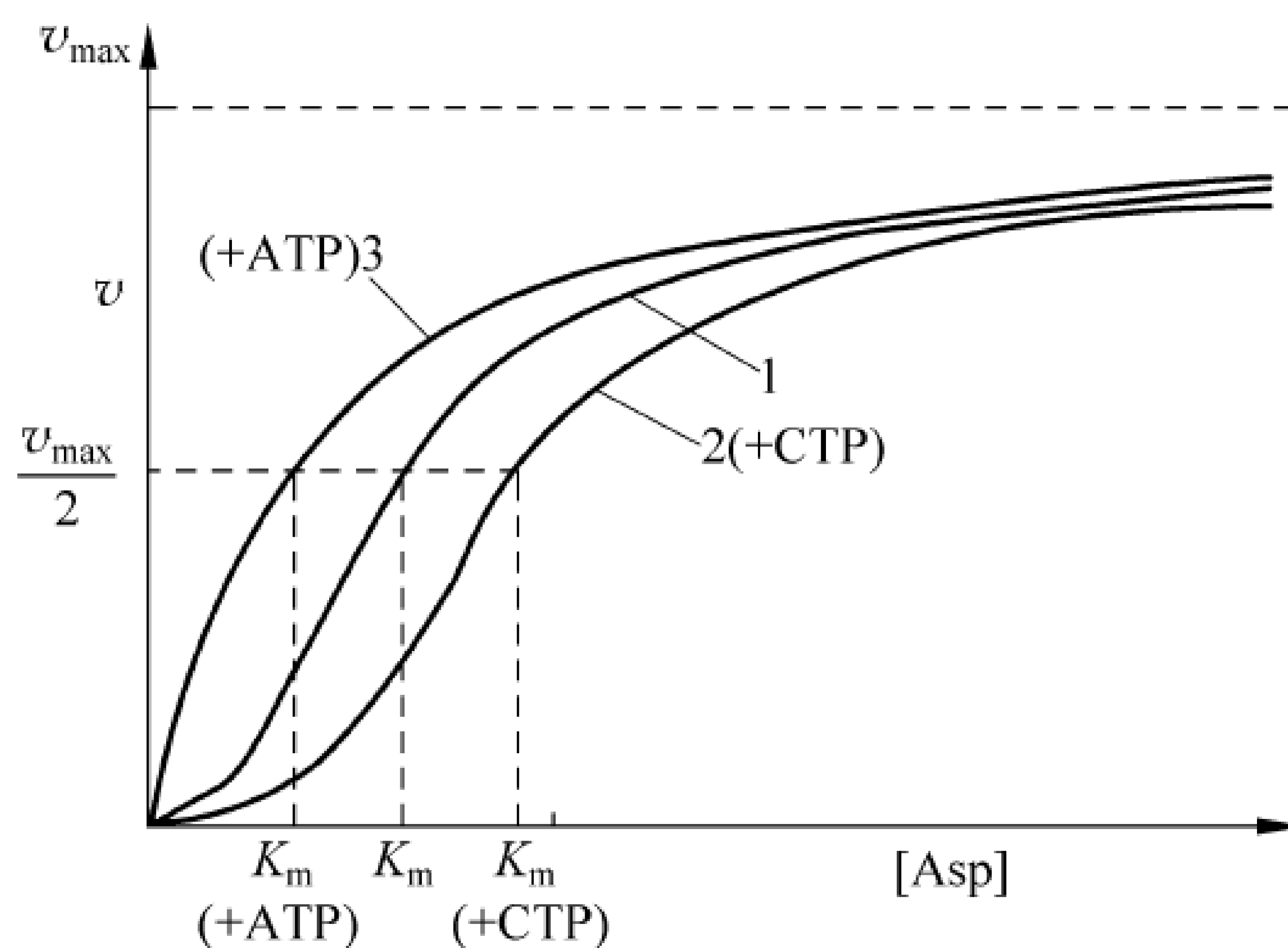


图 4.29　*E. coli* ATCase 反应速度 v 对[Asp]作图

1. v 对底物[Asp]作图；2. CTP 存在下，v 对底物[Asp]作图；3. ATP 存在下，v 对底物[Asp]作图

从图4.29中曲线1可看到,v对[Asp]作图得到的是S形曲线,即底物与酶的结合像氧与血红蛋白结合那样具有协同性。当存在CTP时(曲线2),曲线向右移,使得原来的S曲线更为明显,K_m值明显增大,反应速度降低,但v_{max}并没有改变,所以CTP类似于一个竞争性抑制剂,但结合在活性部位以外的部位。当存在ATP时(曲线3),S形曲线向左移,变成双曲线形,降低了底物对酶结合的协同性,K_m值明显减小,反应速度提高了。

由于CTP是代谢的终产物,它抑制ATCase催化的反应,因而当CTP水平高时,CTP与酶结合后降低CTP合成的速度。当细胞中CTP水平低时,CTP脱离酶,CTP合成加快。而只有当ATP水平远高于CTP时才会发生ATP激活作用,目的是平衡细胞中嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸水平。

ATCase由2个三聚体的催化亚基和3个二聚体的调节亚基组成,底物天冬氨酸和氨甲酰磷酸结合在催化亚基,而ATP和CTP结合在调节亚基上。

2. 两种底物协同结合模型

说明底物(配体)与别构蛋白(或别构酶)结合协同性的引人关注的模型有两个:齐变模型(concerted model)[也称为对称模型(symmetry model)]和序变模型(sequential model)。

齐变模型可用来解释相同配体(例如底物)的协同结合,该模型认为每个亚基存在两种构象:一种是对底物具有高亲和性的松弛型(relaxed,R)构象,另一种是低亲和性的紧张型(tensed,T)构象。两种构象处于平衡,当一种构象转变为另一种构象时,分子对称性不变。所以当蛋白质改变构象时,所有亚基同时发生构象变化,而且每个亚基均呈现相同构象[图4.30(a)]。

序变模型是近年来更为普遍运用的模型,当不结合配体时,别构酶只呈现T构象,只有当配体与酶结合后才能诱导T向R转换,亚基构象转换不是齐变,而是序变。与齐变模型不同的是,在具有部分饱和的一个寡聚分子中,允许存在着高亲和力R构象和低亲和力T构象亚基[图4.30(b)]。序变理论可以解释负协同性,所谓负协同性是指当配体分子依次结合到一个寡聚体时,其亲和性降低。负协同性只出现在像甘油醛-3-磷酸脱氢酶那样的少数的酶中。

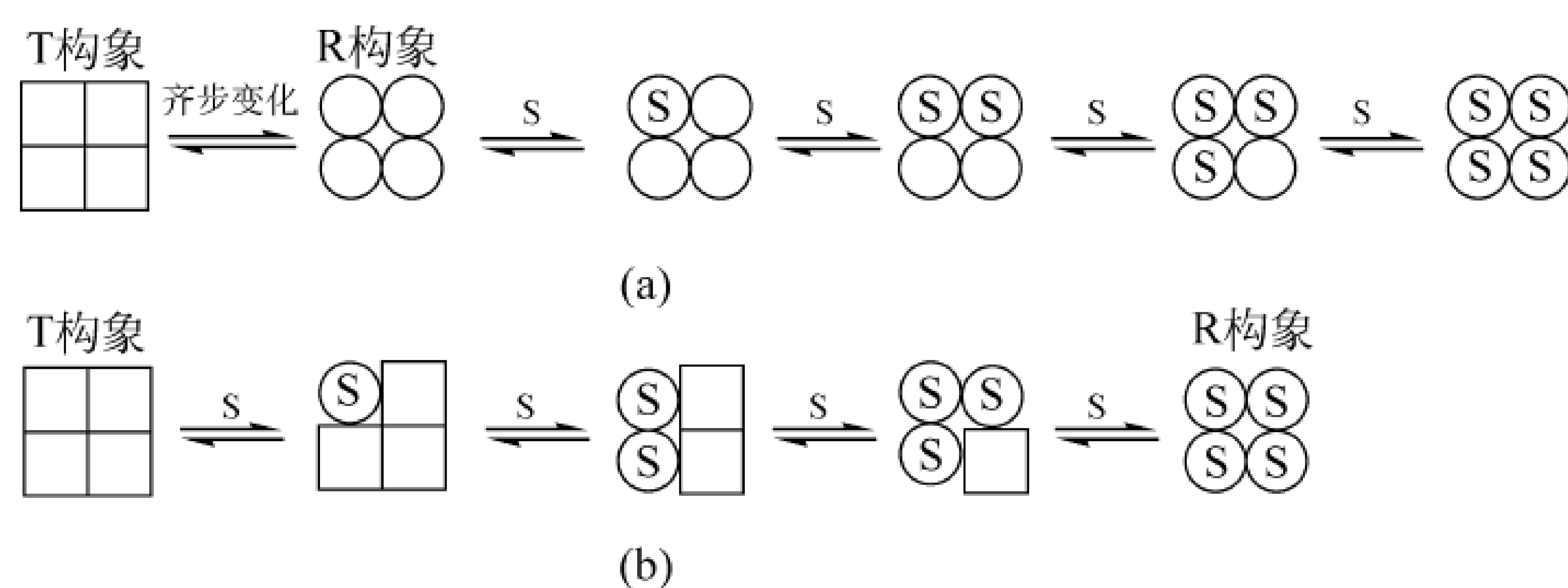


图4.30　配体协同结合的两种模型

(a) 齐变模型,亚基构象齐步转换;(b) 序变模型,配体结合诱导亚基构象序变

3. 共价修饰调节

除了别构调节以外,有些酶的活性通过共价修饰(covalent modification regulation)调节。最主要的共价修饰方式是在蛋白激酶和蛋白磷酸化酶催化下,特定Ser、Thr或Tyr残基的羟基磷酸化和去磷酸化,使受调节的酶处于活性或非活性状态。

图 4.31 给出了通过共价修饰调节丙酮酸脱氢酶活性的过程。丙酮酸脱氢酶是柠檬酸循环丙酮酸脱氢酶复合物的成员，催化丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶 A 和二氧化碳的反应。丙酮酸脱氢酶在丙酮酸脱氢酶激酶催化下因磷酸化而失活；磷酸化的丙酮酸脱氢酶在丙酮酸脱氢酶磷酸酶催化下去磷酸又可恢复活性。

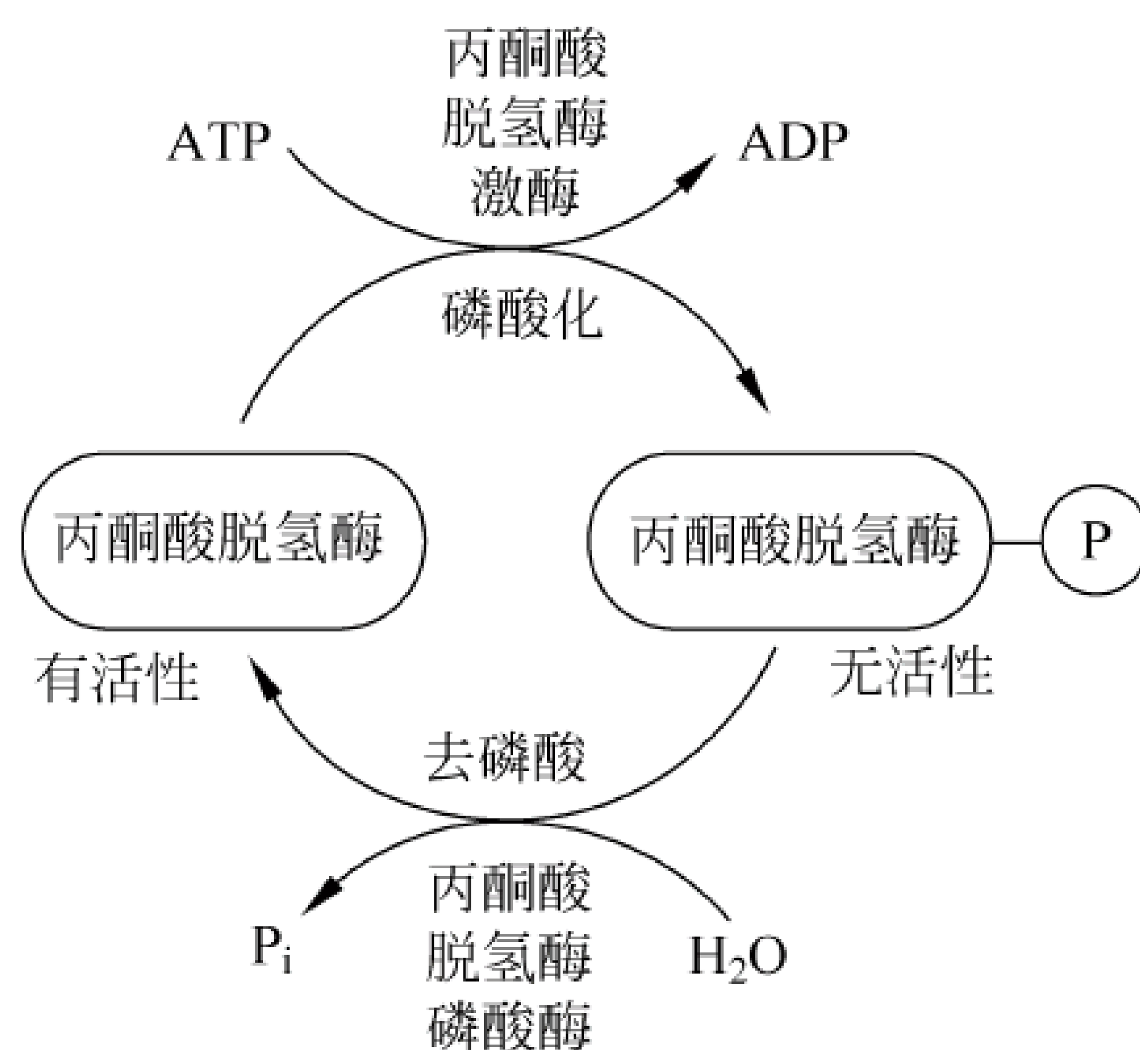


图 4.31 丙酮酸脱氢酶的共价修饰

小结

1. 酶是生物催化剂，其显著特点是催化效率高，以及它们的底物和反应的特异性强。除了少数酶之外，大多数酶都是蛋白质或蛋白质加辅助因子。酶被分为六大类：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶和连接酶。

2. 酶是通过降低反应活化能加快反应速率。酶催化机制包括酸碱催化、共价催化、金属离子催化及底物靠近和定向效应。

3. 大多数酶具有共同的动力学特征，在固定的酶浓度下，随着底物浓度的增加，催化活力呈双曲线方式升高，并接近最大的 v_{max}。米氏方程描述了动力学曲线，使反应速度达到最大值一半时的底物浓度定义为米氏常数 K_m。K_m是酶对底物亲和力的量度：K_m越小，表明酶对底物的亲和力越大。

4. 一个酶的催化常数(k_{cat})，或称为酶转换数指的是每秒钟每一分子酶(或每一活性部位)可以催化转化为产物的底物的最大分子数。k_{cat}/K_m比提供了一个酶的催化效率的测量。

5. 抑制剂可降低酶催化反应的速度。可逆抑制剂分为竞争性的(K_m增加，而 v_{max}不变)、反竞争性的(K_m和 v_{max}都成比例降低)、非竞争性的(K_m不变，而 v_{max}降低)或混合型的。不可逆酶抑制剂与酶形成共价键。

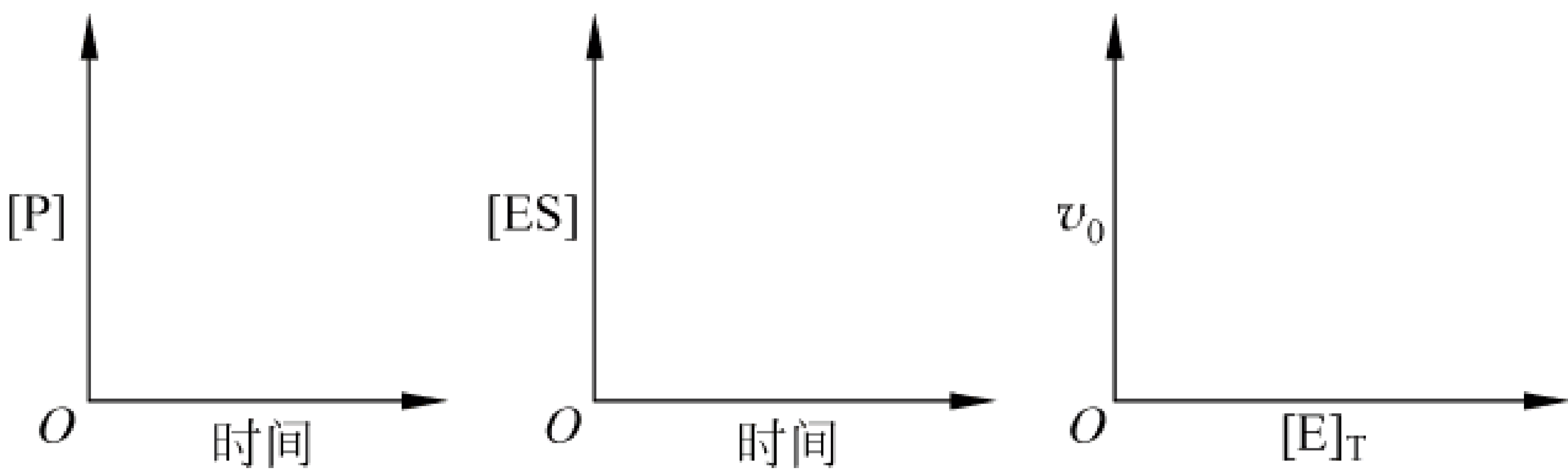
6. 酶活性的调节分为别构调节和共价调节。别构调节剂与酶的活性部位以外的部位结合，改变酶的活性。描述别构酶协同性的模式有两种：齐变和序变模式。酶的共价修饰通常为磷酸化也可以调节酶的活性。

习题

1. 尽管 Asp101 和 Arg114 残基离活性位点的 Glu35 和 Asp52 有一定的距离,但溶菌酶有效催化需要它们。虽然将 Asp101 或 Arg114 替换成 Ala 并不明显改变酶的三级结构,但是却会明显降低酶的催化活性。请解释。

2. 在一个酸催化的酶促反应中,质子化的 His 残基作为质子供体,当 pH 超过该残基的 pK 时,酶活性将发生怎样的变化?

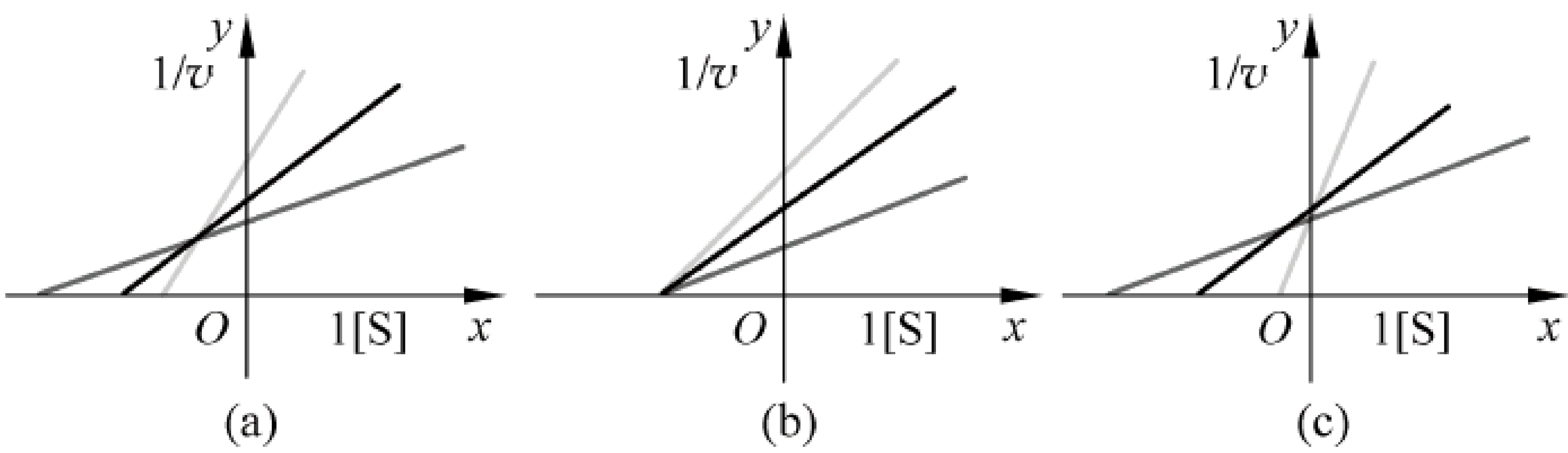
3. 对于一个酶催化反应,请画出以下变量之间合适的关系图(假设底物过量)。其中[P]为产物浓度,[ES]为酶-底物复合物浓度,$[E]_T$ 为酶的总浓度,v_0 为反应初速度。



4. 对于胰凝乳蛋白酶与底物酪氨酸苯甲酯反应,在 6 个不同底物浓度下测得的初速度值如下。利用这些数据给出 v_{max} 和 K_m 大约值。

mmol [S]	0.001 25	0.01	0.04	0.10	2.0	10
v_0/(mmol/min)	14	35	56	66	69	70

5. 对于一单底物的酶催化反应,下面 3 个双倒数曲线图中哪一个是 3 种不同酶浓度下的曲线图?请解释。



6. 酶 A 催化反应 S→P,K_m 为 50μmol,而 v_{max} 为 100nmol/s。酶 B 催化反应 S→Q,K_m 是 5mmol,v_{max} 为 120nmol/s。当 100μmol 的 S 加入到含有等量酶 A 和 B 的混合液中,过 1 分钟后,哪个反应产物更多些,P 还是 Q?

7. 在双底物反应中,少量的第一个产物 P 被核素标记(P^*),然后加入到酶和第一个底物 A 中。没有 B 或 Q 存在。如果反应遵循(a)乒乓机制或(b)有序机制,那么 A(=P—X)会变成核素标记(A^*)吗?

8. 遵循米氏动力学的一个酶的 K_m 为 1μmol。当底物浓度[S]为 100μmol 时,初速度为 0.1μm。当[S]分别为(a)1mmol,(b)1μmol 或(c)2μmol 时,初速度各为多少?

9. 假定有一酶,若使其活化,需将活性部位组氨酸(pK_R= 6.0)的咪唑基质子化,使其能和底物中谷氨酸残基侧链的带负电荷的 γ 羧基(pK_a= 4.25)相作用。仅考虑这一种作用,你认为此反应的最佳反应 pH 是多少?为什么?

10. 人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)编码该病毒组装和成熟所必需的一个蛋白酶(M_r21,500)。该蛋白酶催化七肽底物的水解,其中 k_{cat} 为 1000/s,而 K_m 为 0.075mol。

(a) 计算当 HIV-1 蛋白酶为 0.2mg/ml 时底物水解的 v_{max}。

(b) 当七肽的—C(O)NH—被—CH_2NH—取代,生成的衍生物不能被该蛋白酶水解,反而成了一个抑制剂。在像(a)同样实验条件下,但抑制剂为 2.5μmol,v_{max} 为 9.3×10^{-3} mol/s。这是哪种类型的抑制作用?

11. 人体内许多酶最初合成的都是没有活性的酶原,这样做有什么必要性和益处?

12. 新掰下的玉米的甜味是由于玉米粒中的糖浓度高引起的。可是掰下的玉米储存数天后就不那么甜了,因为 50%糖已经转化为淀粉。如果将新鲜玉米去掉外皮后浸入沸水数分钟,然后于冷水中冷却,储存在冰箱中可保持其甜味。这是什么道理?

5　辅酶与维生素

在酶一章中已经了解到酶结合底物并将它转化为产物的催化活性依赖于酶活性部位的一些氨基酸残基，但实际上有些酶只靠酶中蛋白质部分不能表现出酶的活性或全部活性，还需要称为辅助因子(cofactor)的非蛋白成分，就是说辅助因子与酶蛋白组合才能形成具有活性的全酶(holoenzyme)。

5.1　辅助因子

辅助因子分为两种类型：必需离子(主要是金属离子)和称为辅酶(coenzyme)的有机化合物。现在已知的酶中约 1/4 都需要金属离子，这些需要金属的酶又分为金属酶和金属活化酶，在酶一章中已介绍过。

根据与脱辅基酶(apoenzyme)作用的差别，辅酶被分为两类：一类实际上是酶催化反应中的底物，通常称为共底物(cosubstrate)的辅酶，共底物在反应过程中可被替换和从活性部位脱离，在细胞内可重复循环利用。另一类辅酶称为辅基(prosthetic group)，辅基在反应过程中始终与酶结合，有的辅基是通过共价键与脱辅酶结合，有的是通过许多弱的相互作用与活性部位紧密结合。辅酶通常参与催化反应中的基团、氢质子或电子的转移。

绝大多数辅酶是 B 族维生素的衍生物，这些维生素是包括人在内的哺乳动物的营养素，自己不能合成，必须通过食物获得。维生素(vitamin)分为水溶性维生素(water-soluble vitamin)和脂溶性维生素(lipid-soluble vitamin)。水溶性维生素，例如 B 族维生素日需求量很少，且很容易随尿排泄掉，每天都需要补充。而脂溶性维生素，例如维生素 A、维生素 D 等可以被动物储存，但摄入过量可能导致中毒。

本章主要介绍由 B 族维生素衍生的辅酶，表 5.1 给出了主要的辅酶，以及来源于哪种维生素和在代谢中的作用。

表 5.1　主要的辅酶

辅　　酶	维　生　素	主要的代谢作用	反应中角色
尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+) 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$)	尼克酸(烟酸)	涉及双电子转移的氧化还原反应	共底物
黄素单核苷酸(FMN) 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	维生素 B_2(核黄素)	涉及单和双电子转移的氧化还原反应	辅基
辅酶 A	维生素 B_3(泛酸)	酰基转移	共底物
硫胺素焦磷酸(TPP)	维生素 B_1(硫胺素)	包含羰基的二碳单位转移	辅基

续表

辅　　酶	维　生　素	主要的代谢作用	反应中角色
磷酸吡哆醛(PLP)	维生素 B_6(吡哆醛)	氨基转移	辅基
生物胞素	生物素	依赖 ATP 的底物羧化或底物之间的羧基转移	辅基
四氢叶酸	叶酸	一碳单位转移	共底物
腺苷钴胺素	维生素 B_{12}(钴胺素)	分子内基团重排	辅基
甲钴胺素	维生素 B_{12}(钴胺素)	甲基化	辅基
硫辛酰胺	硫辛酸	来自 TPP 的羟烷基的氧化和酰基转移	辅基
	维生素 C(抗坏血酸)	羟基化反应	
视黄醛	维生素 A	视觉	辅基
维生素 K	维生素 K	某些谷氨酸残基的羧化	辅基

5.2　NAD^+和 $NADP^+$

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$)是第一个被确认的辅酶,两者都含有烟酰胺(尼克酰胺,nicotinamide)。烟酰胺是维生素烟酸(尼克酸,nicotinic acid)的衍生物(图 5.1)。因为烟酸是吡啶的 3-羧酸衍生物,所以含有烟酰胺的辅酶经常被称作吡啶核苷酸辅酶。烟酸也称为抗癞皮病因子(pellagra-preventive factor),因为缺少烟酸会使人患癞皮病(pellagra)。

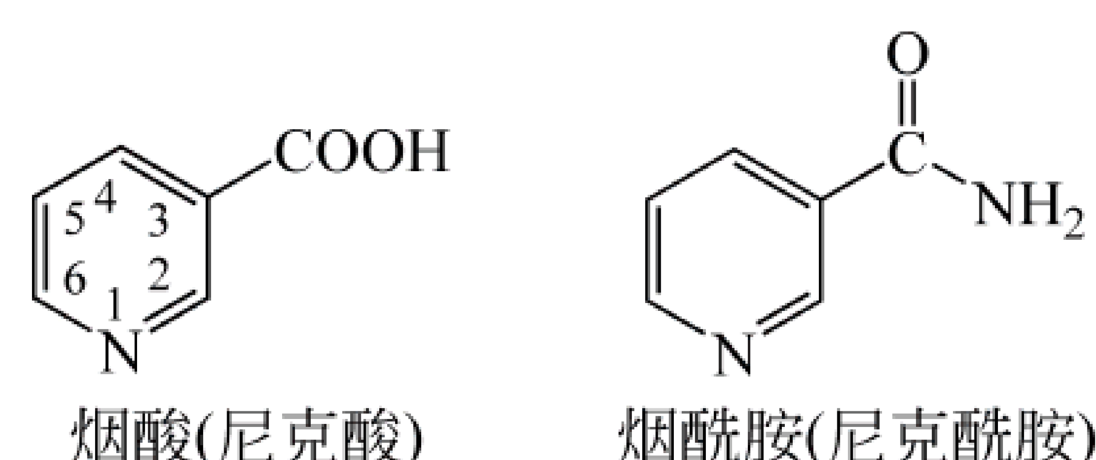


图 5.1　烟酸和烟酰胺

图 5.2 给出了氧化型 NAD^+ 和 $NADP^+$ 及它们的还原型 NADH 和 NADPH 结构。两种辅酶都含有由磷酸酐键连接的腺苷酸(AMP)和尼克酰胺单核苷酸(NMN),但要注意的是在 $NADP^+$ 和 NADPH 结构中腺苷酸中的核糖 2′位上还连有一个磷酸基团。

NAD^+ 和 $NADP^+$ 几乎总是作为脱氢酶的共底物,通过将底物中的两个电子和一个质子以 H^- 形式转移到 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的 C-4 上,使底物氧化并生成还原型的 NADH+H^+ 或 NADPH+H^+。例如催化乳酸转化为丙酮酸的乳酸脱氢酶就是一个依赖于 NAD^+ 的酶(图 5.3)。

涉及吡啶核苷酸的氧化和还原反应总是同时发生双电子的转移,所以 NADH 和 NADPH 通常被称为具有还原能力的分子。NADH 主要是在分解代谢中生成,在线粒体被氧化产生大量的 ATP;而 NADPH 可以提供还原能力用于生物合成。

NADH 和 NADPH 由于含有二氢吡啶环,在 340nm 处有一吸收峰,但 NAD^+ 和 $NADP^+$ 在这个波长没有吸收峰,所以 340nm 处吸收的出现和消失可以用作监测与氧化和还原相关的脱氢酶催化反应的指标(图 5.4)。

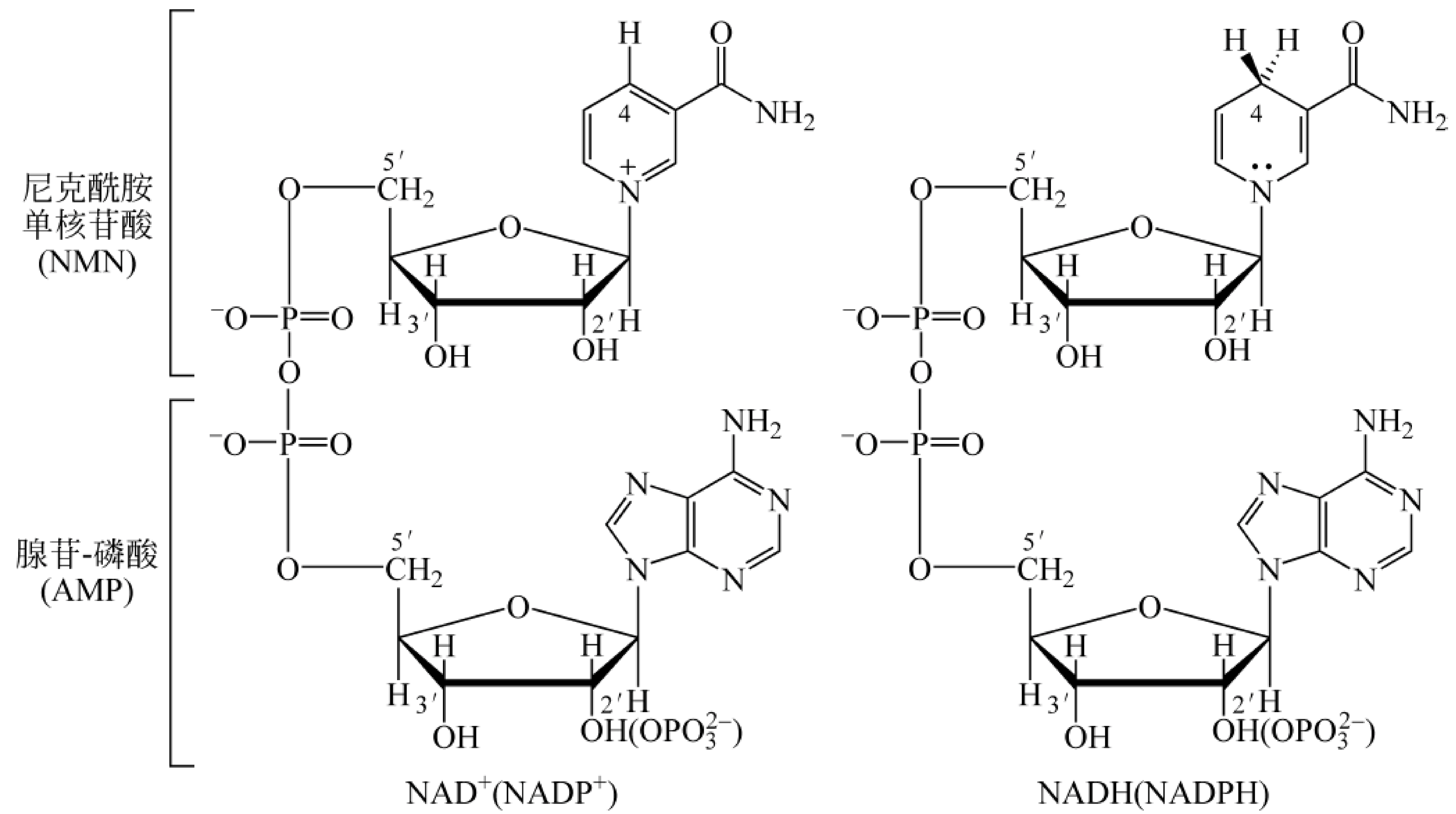


图 5.2　氧化型 NAD^+、$NADP^+$ 结构及还原型 NADH、NADPH 结构

当表示 $NADP^+$ 和 NADPH 结构时，2′位的羟基部分为 OPO_3^{2-}

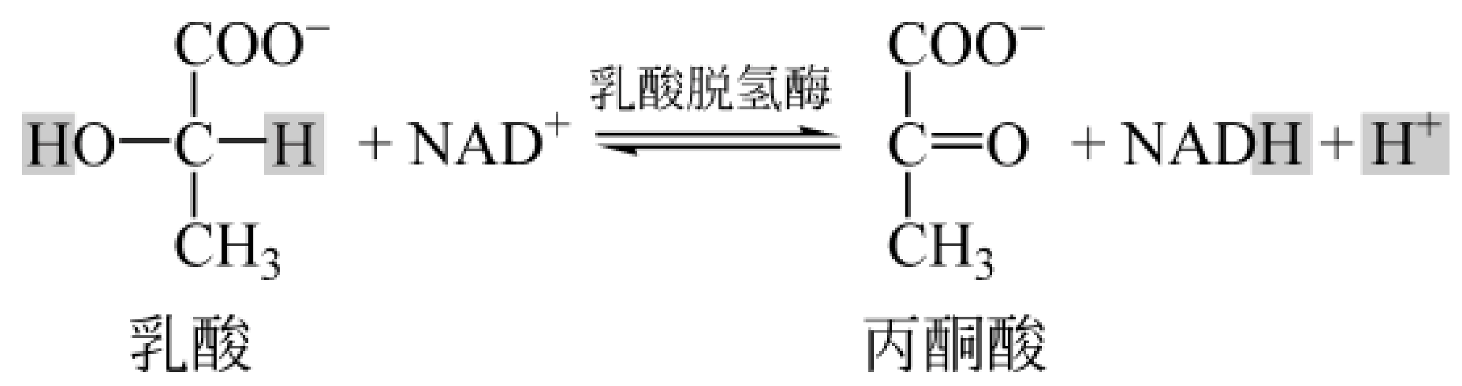


图 5.3　乳酸脱氢酶

辅酶 NAD^+ 参与脱氢反应，在反应中被还原为 NADH

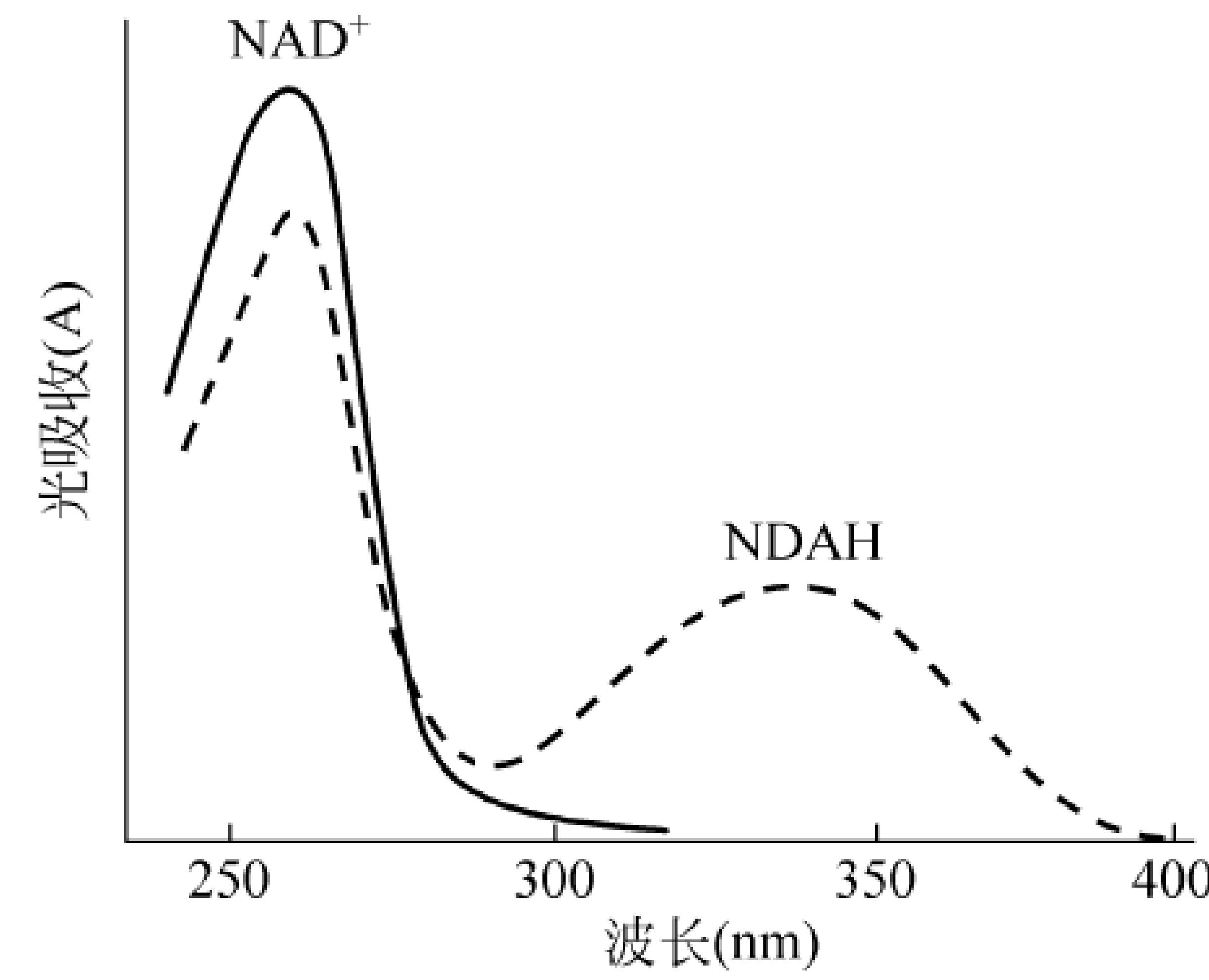


图 5.4　NAD^+(实线)和 NADH(虚线)紫外吸收光谱

除了与 NAD^+ 一样在 260nm 有吸收峰以外，NADH 在 340nm 还有一特征峰

5.3　FMN 和 FAD

辅酶黄素单核苷酸(flavin mononucleotide,FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide,FAD)是核黄素(riboflavin)的衍生物,核黄素由核糖醇和 7,8-二甲基异咯嗪构成(图 5.5)。细菌、原生生物、真菌、植物和某些动物可以合成核黄素,但哺乳动物不能合成,需从食物中获得。

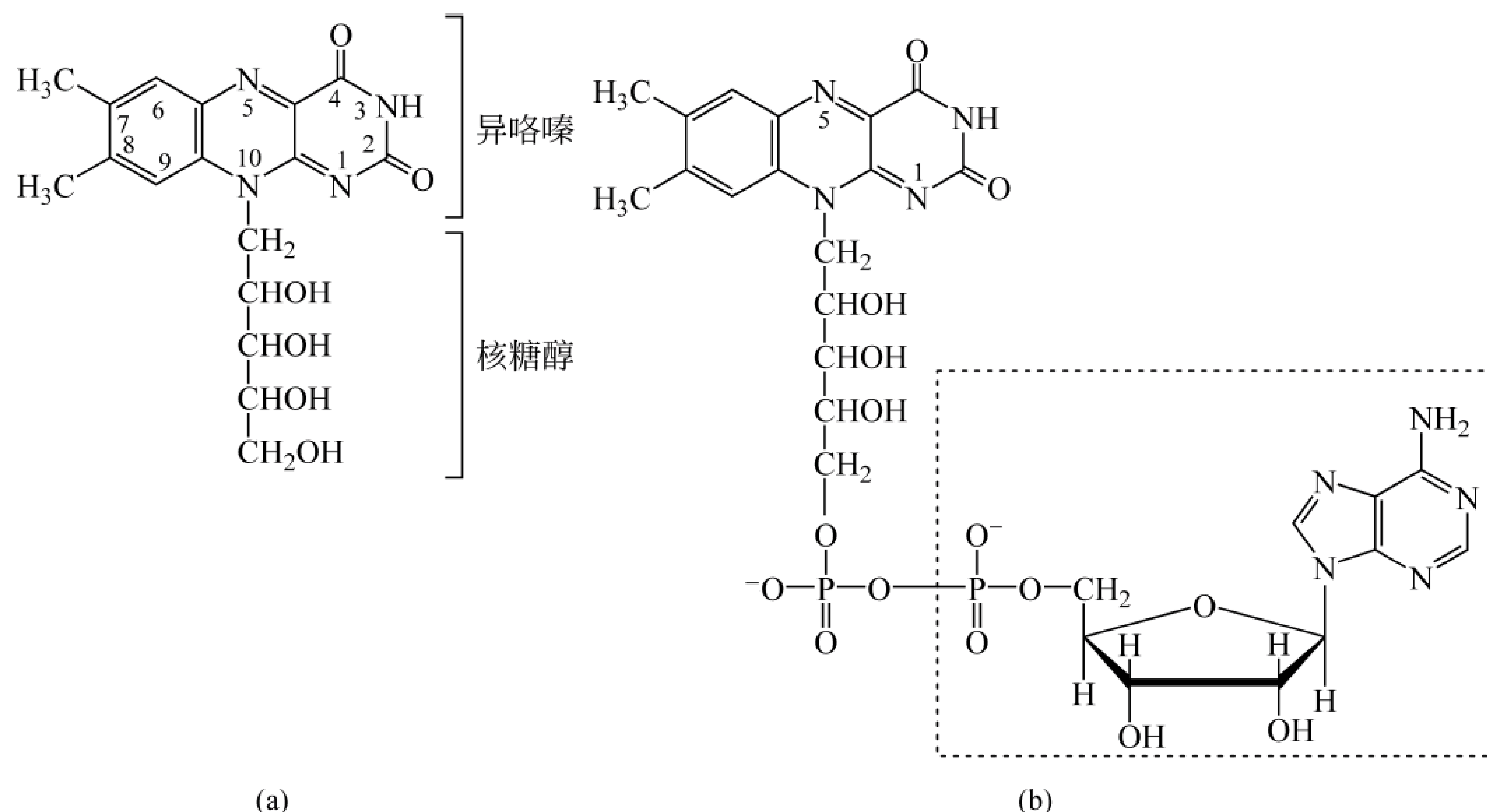


图 5.5　辅酶 FMN 和 FAD

(a) 核黄素;(b) FMN(不包括虚线部分)和 FAD(包括虚线框内部分)

许多氧化还原酶需要 FAD 或 FMN 作为辅基,这样的酶常称为黄素酶(flavoenzyme)或黄素蛋白(flavoprotein)。在氧化还原反应中 FAD 或 FMN 被还原为 $FADH_2$ 或 $FMNH_2$。FAD 和 FMN 在 445～450nm 波长范围内有吸收,显黄色,但 $FADH_2$ 和 $FMNH_2$ 却是无色的,因为被还原后异咯嗪的共轭双键系统消失了。

FAD 或 FMN 可以一次接收 $2H^+$ 和 $2e^-$ 被还原为 $FADH_2$ 和 $FMNH_2$,也可以先接收一个 H^+ 和一个 e^- 后转换为 FMNH · 和 FADH · (半醌型),半醌型再接收一个 H^+ 和一个 e^- 转换为 $FADH_2$ 和 $FMNH_2$(氢醌型)。反之 $FADH_2$ 和 $FMNH_2$ 也可以经历半醌型中间产物,一次给出一个 H^+ 和 e^- 最后转换为氧化型 FAD 或 FMN(图 5.6)。

FAD 或 FMN 经历半醌型转换为 $FMNH_2$ 和 $FADH_2$,或其逆过程具有重要生物学意义。就像在第 16 章看到的那样,在线粒体中 FAD 和 FMN 可以参与电子传递链的单电子传递。例如当 FMN 接收 $2H^+$ 和 $2e^-$ 被还原为 $FMNH_2$ 后,$FMNH_2$ 可以经半醌型每次给出一个电子使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+},进行单电子转移。

由于 FAD 和 FMN 作为体内许多酶的辅基,参与糖、脂肪和蛋白质代谢中的各种氧化还原反应,所以体内缺乏核黄素,直接导致 FAD 和 FMN 的缺乏,影响体内的代谢。当体内缺乏核黄素时会引起口角炎和唇炎等皮肤炎症,临床常用核黄素治疗这些炎症。牛奶、谷物和肝等食物中富含核黄素。

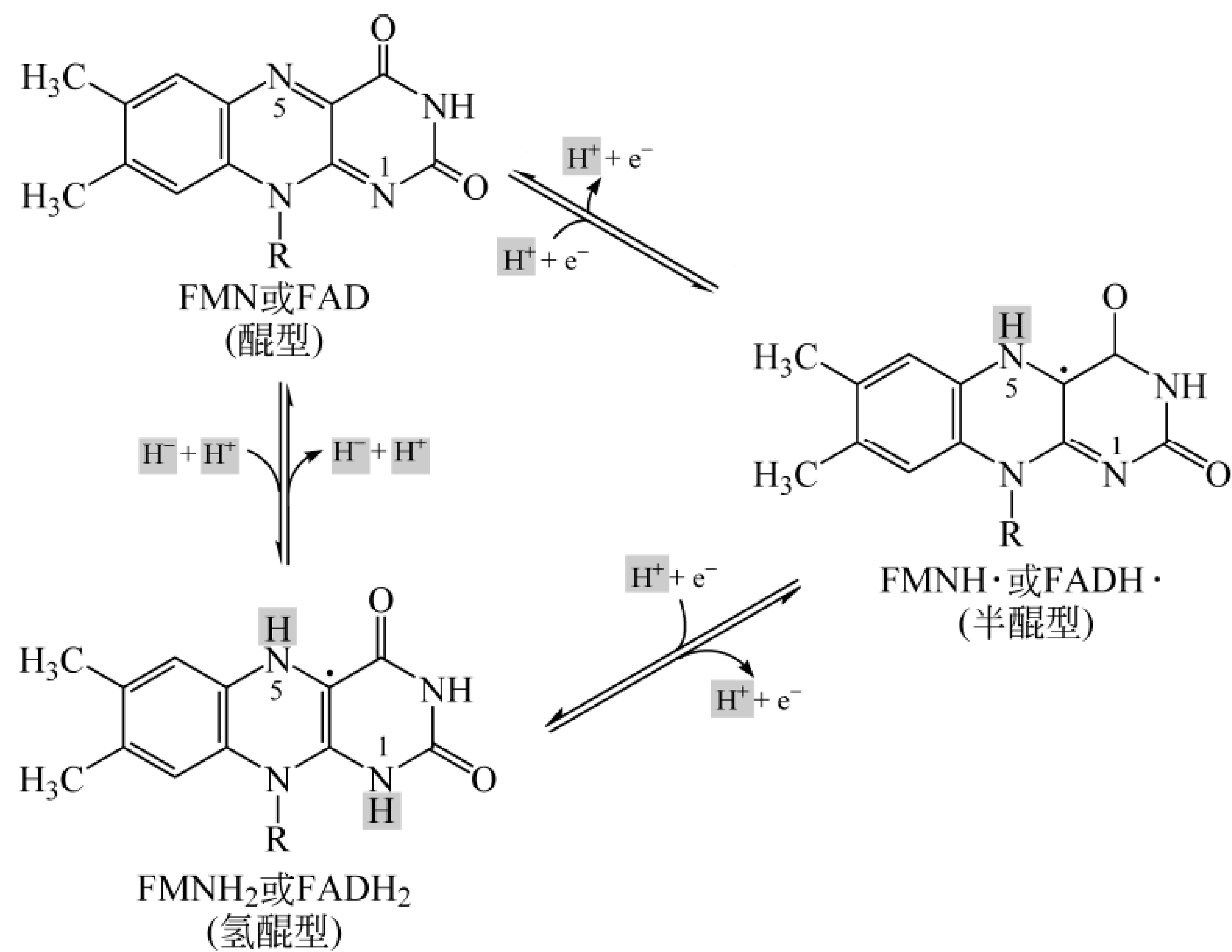


图 5.6　FMN 或 FAD 的氧化和还原

图中 R 代表 FMN 或 FAD 侧链核醇部分,氢醌型中两个 H 分别结合在 1 位和 5 位上

5.4　辅酶 A

辅酶 A(coenzyme A,缩写为 CoA 或 HS-CoA 、CoASH)是维生素泛酸(pantothenate)的衍生物。辅酶 A 由 3 部分构成:带有一个游离—SH 的巯基乙胺、泛酸及 3′-羟基被磷酸基团酯化的 ADP,反应中心是—SH 基团(图 5.7)。

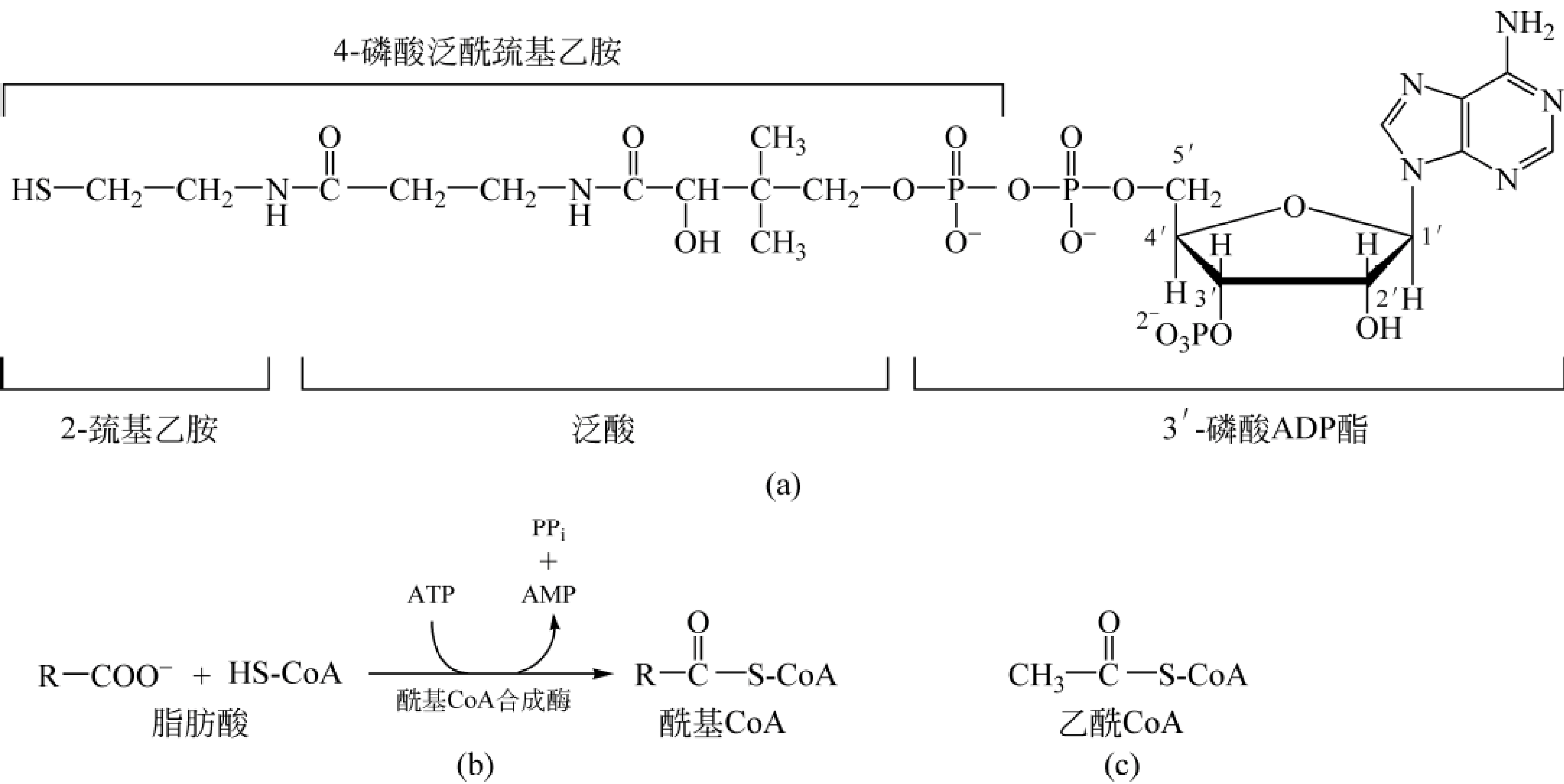


图 5.7　辅酶 A

(a) 辅酶 A 结构;(b) HS-COA 参与酰基转移反应;(c) 乙酰 CoA

ATP:腺苷三磷酸;AMP:腺苷酸;PP_i:焦磷酸

辅酶A作为酰基载体参与酰基转移反应。例如，在酰基CoA合成酶催化下，CoA作为载体与脂肪酸生成酰基CoA的反应。最简单的酰基CoA是乙酰CoA，在讨论糖、脂肪酸和氨基酸代谢时将会经常遇到。

5.5　硫胺素焦磷酸

辅酶硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate，TPP)是硫胺素(thiamine)的衍生物。硫胺素也称为抗脚气病因子(antiberiberi factor)，因为人缺少硫胺素会患有脚气病，一种多发性神经炎，不是那种因真菌感染引起的脚癣。硫胺素含有一个嘧啶环和一个带正电荷的噻唑环。在动物细胞内，辅酶硫胺素焦磷酸是在硫胺素焦磷酸合成酶催化下由饮食中的硫胺素合成的，噻唑环中的2位C是辅酶的反应中心(图5.8)。

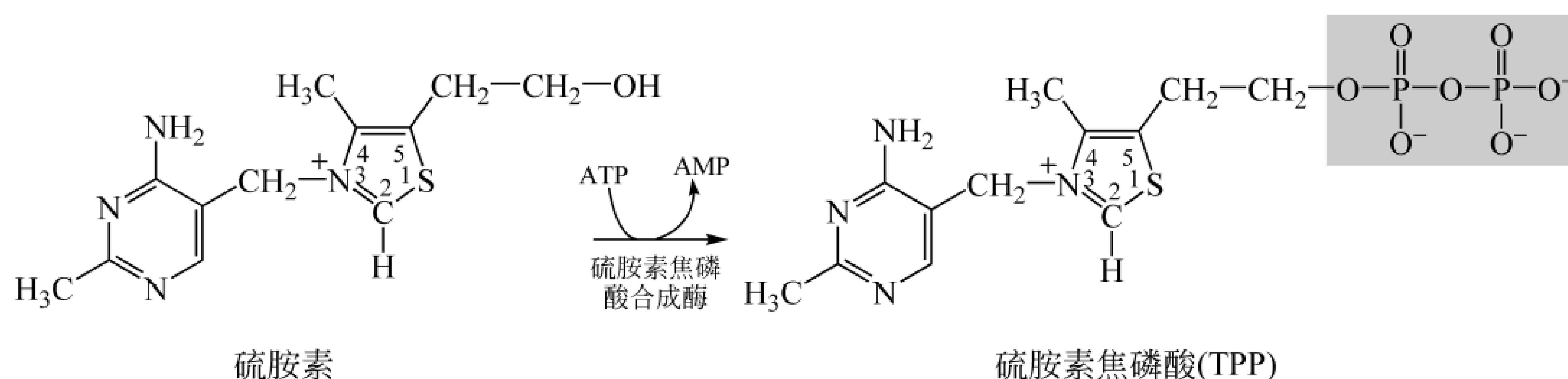


图5.8　硫胺素焦磷酸的形成

ATP：腺苷三磷酸；AMP：腺苷酸；PP_i：焦磷酸

第一个成功纯化出来的TPP来自酵母，它是丙酮酸脱羧酶的辅基。丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸⟶CO_2＋乙醛。丙酮酸脱羧首先转化为羟乙基硫胺素焦磷酸(hydroxyethylthiamine pyrophosphate，HETPP)，然后生成乙醛(图5.9)。

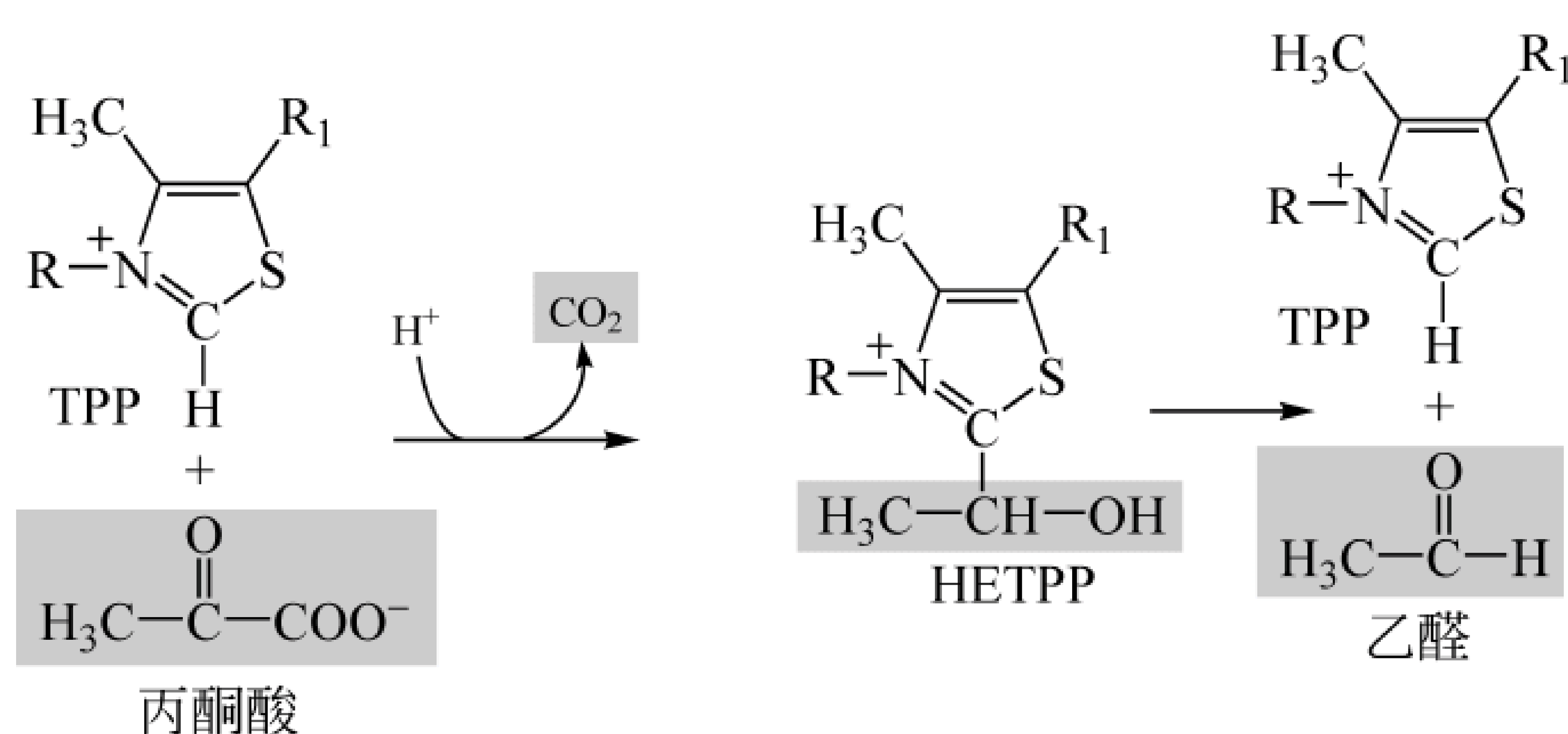


图5.9　丙酮酸脱羧反应机制

图中未给出整个酶，只给出了TPP作为酶辅基起的作用，图中R代表TPP中的嘧啶环部分，而R_1代表焦磷酸部分

硫胺素在米糠和肝中含量丰富，经常食用精米的人容易得脚气病，因为除去的米糠中含有必需的维生素硫胺素。

5.6 吡哆醛磷酸

辅酶吡哆醛磷酸(pyridoxal phosphate,PLP)和吡哆胺磷酸(pyridoxamine phosphate)是维生素 B_6 的衍生物。维生素 B_6 广泛存在于植物和动物中,包括吡哆醇(pyridoxine)、吡哆醛(pyridoxal)和吡哆胺(pyridoxamine) 3 个成员,它们的区别只是在吡啶环第 4 位碳的氧化或氨基化上(图 5.10)。

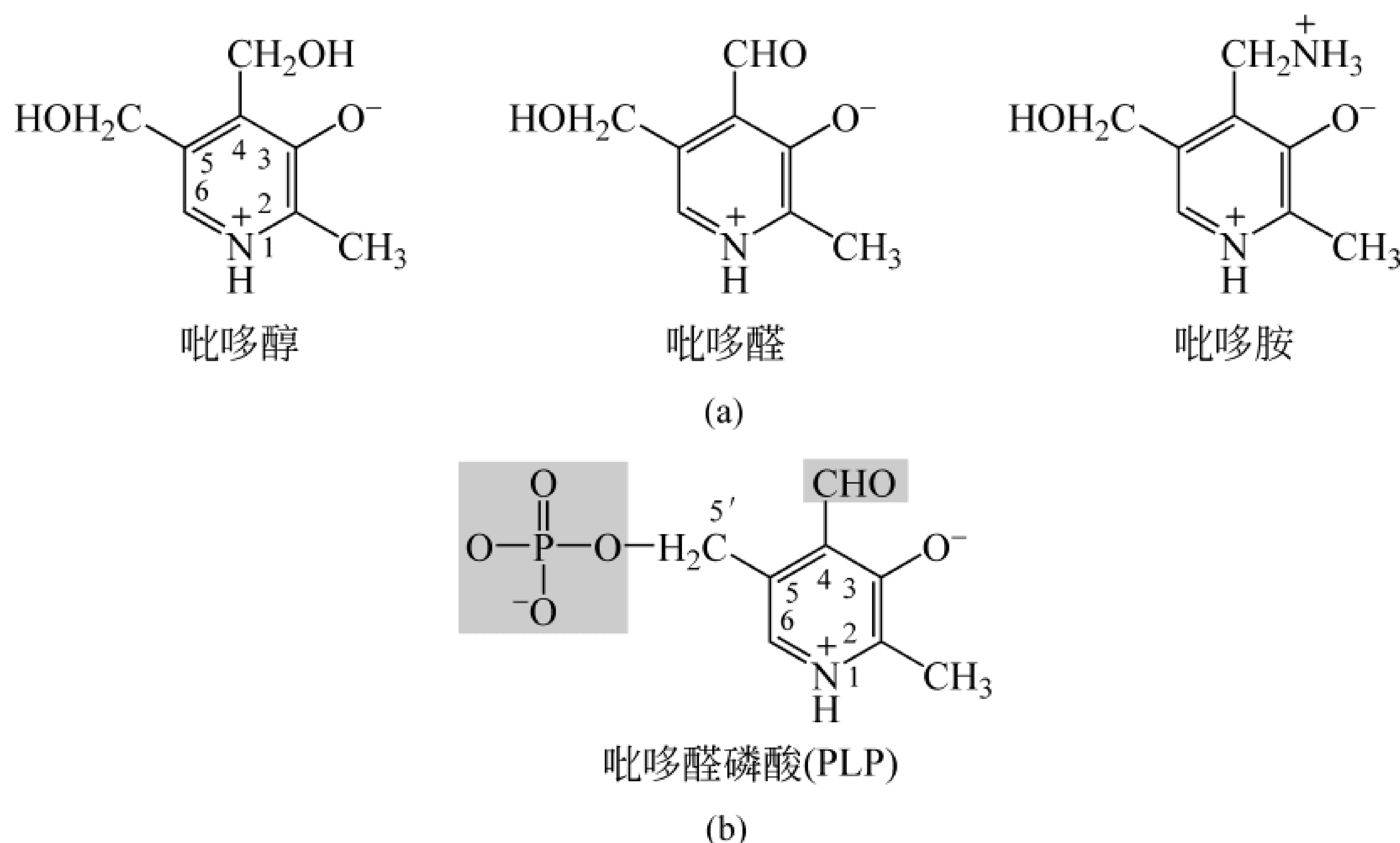


图 5.10 维生素 B_6 和吡哆醛磷酸

(a) 维生素 B_6 结构;(b) 辅酶吡哆醛磷酸(吡哆醛-5′-磷酸)醛基(—CHO)是 PLP 的反应中心

吡哆醛磷酸是很多酶的辅基,参与催化涉及氨基酸的各类反应,其中包括转氨、异构化、脱羧、消除和外消旋化等反应。吡哆醛磷酸通过许多弱的非共价键作用与酶紧密结合,当酶不行使功能时,酶与吡哆醛磷酸之间通过共价键形成内醛亚胺(Schiff's base,席夫碱),防止 PLP 丢失。依赖于 PLP 的酶催化的主要反应是转氨反应,图 5.11 给出了依赖于 PLP 的转氨酶催化的转氨反应及反应机制。

图 5.11(a)表示的是转氨反应式,PLP 作为转氨酶的辅基,催化一个 α-氨基酸的氨基转移到另一个 α-酮酸上,α-氨基酸脱去氨基后生成相应的 α-酮酸,而接收氨基的起始 α-酮酸生成一个新的 α-氨基酸。

图 5.11(b)表示的是 PLP 作为辅基参与转氨反应的机制,在整个反应过程中酶与 PLP 始终结合着。首先侧链为 R_1 的 α-氨基酸取代 E-PLP 中的赖氨酸与 PLP 形成外醛亚胺(Schiff's base,席夫碱),然后外醛亚胺互变异构化生成酮亚胺,酮亚胺水解释放出侧链为 R_1 的 α-酮酸和生成吡哆胺磷酸。然后吡哆胺磷酸与另一个底物 α-酮酸(R_2 为侧链)生成酮亚胺,经互变异构化生成外醛亚胺,经水解生成侧链为 R_2 的新的 α-氨基酸和 PLP,PLP 与酶重新形成内醛亚胺(E-PLP 形式),完成一个转氨的反应循环。

谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transferase,GOT)和谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase,GPT)是两个常规体检指标。GOT 催化氨基由谷氨酸转给草酰乙酸生成天冬氨酸的反应,GOT 水平测定常作为心肌梗死诊断指标之一。GPT 催化氨基由谷氨酸转给丙酮酸生成丙氨酸的反应,GPT 水平测定为肝炎诊断指标之一(图 19.12)。

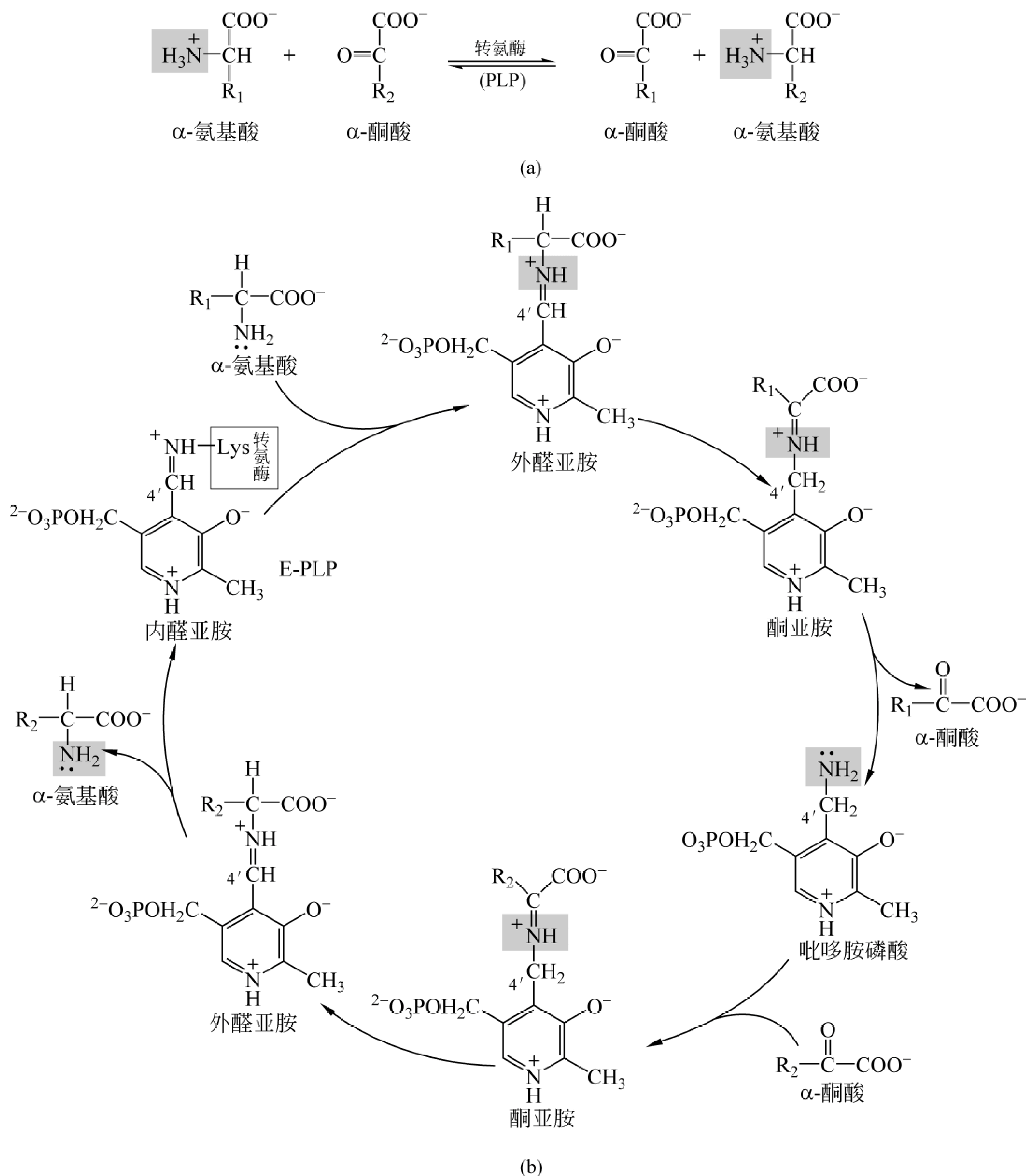


图 5.11　转氨反应

（a）转氨反应式，R_1 代表参加反应起始 α-氨基酸的侧链，而 R_2 代表起始 α-酮酸的侧链；（b）PLP 作为辅基参与转氨反应的机制，E-PLP 表示酶与 PLP 结合形成的复合物，反应过程中酶始终与 PLP 结合着

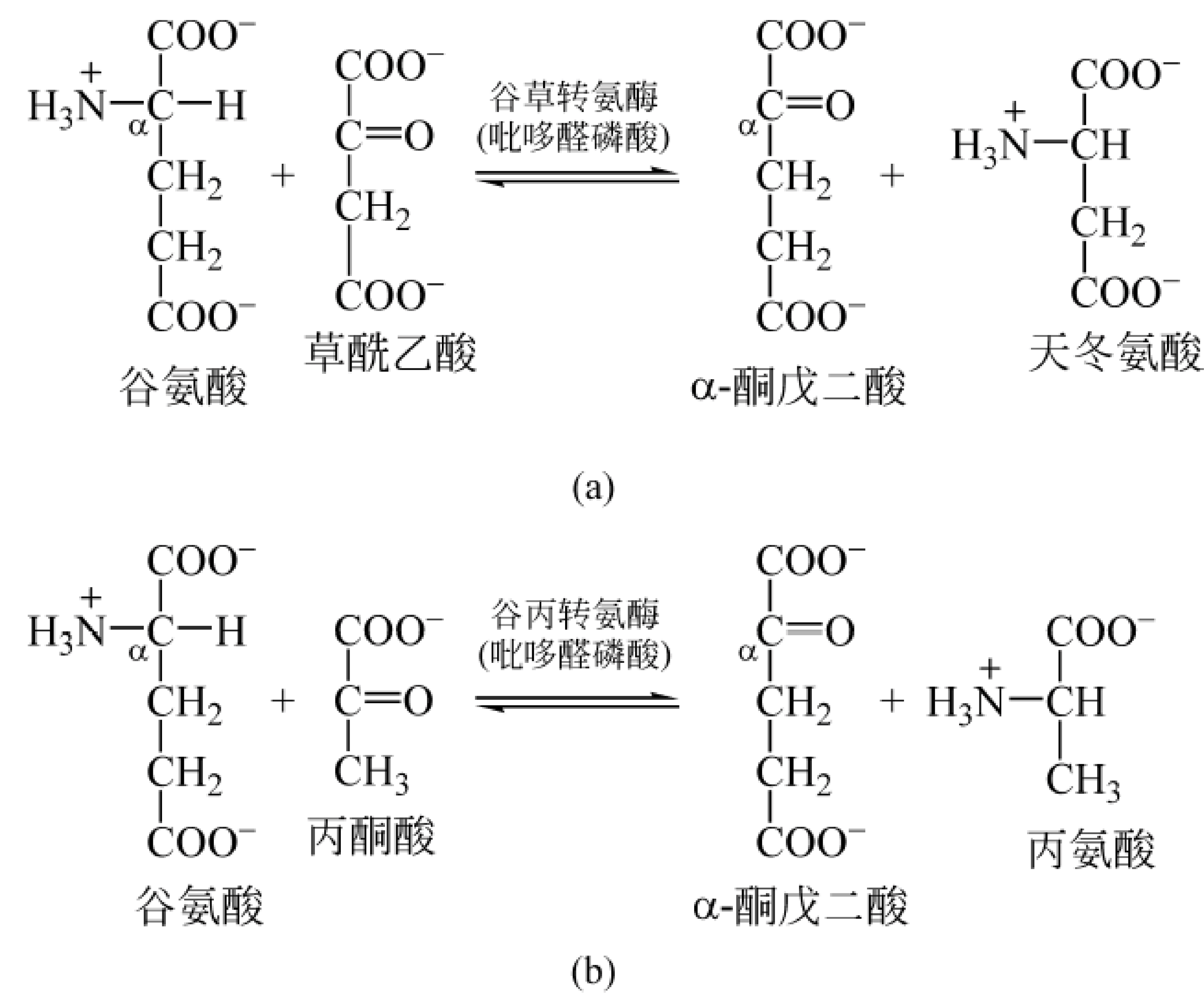


图 5.12　两个主要转氨反应

(a) 谷草转氨酶反应；(b) 谷丙转氨酶反应

5.7　生物素

生物素(biotin)常作为酶的辅基参与羧基转移反应和羧化反应。生物素通过酰胺键与酶活性部位中的一个赖氨酸残基的 ε-氨基共价连接,生物素酰-赖氨酰部分也称为生物胞素(biocytin)(图 5.13)

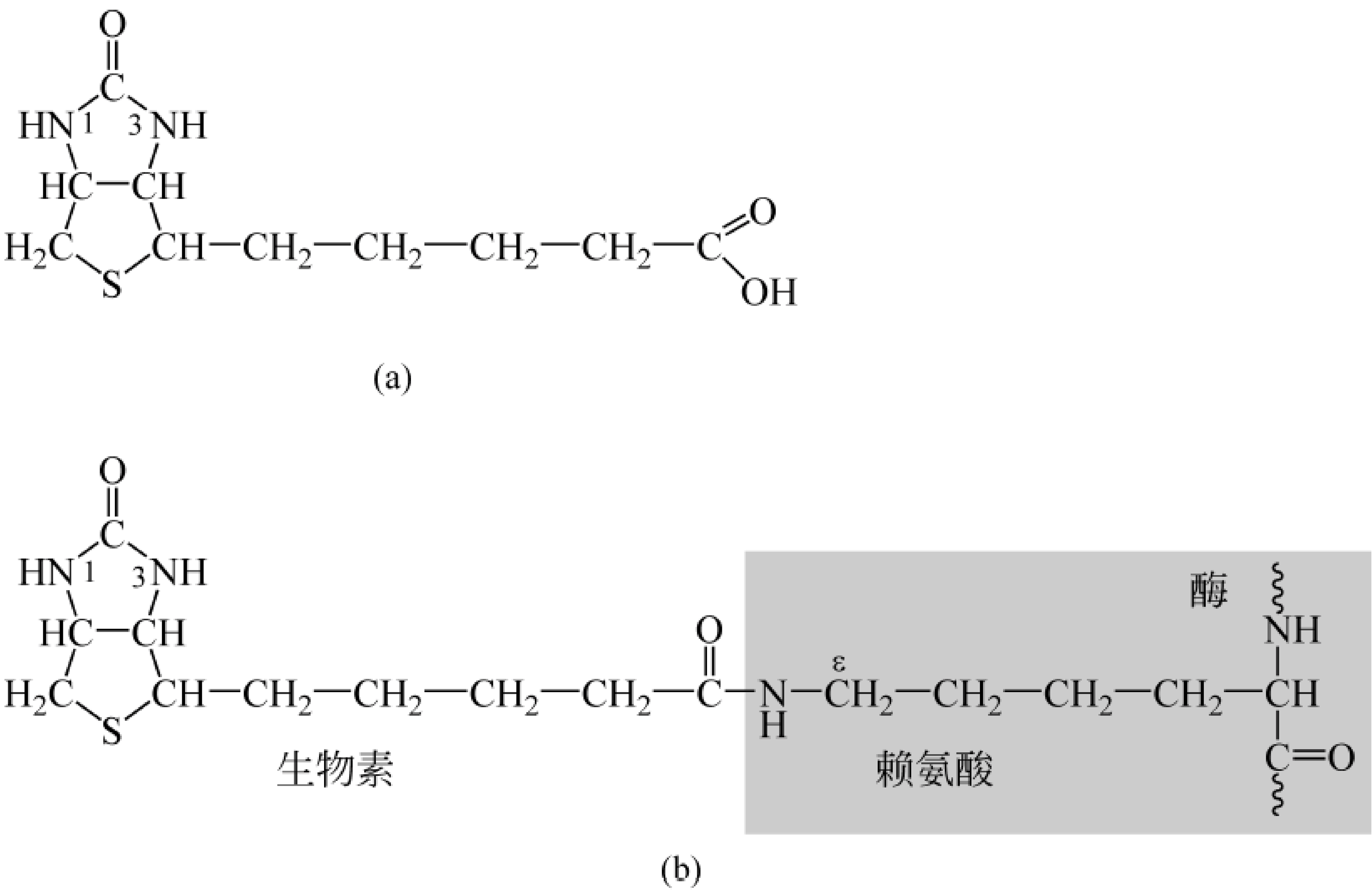


图 5.13　生物素

(a) 生物素；(b) 生物素通过酰胺键与酶活性部位的赖氨酸残基的 ε-氨基共价连接,形成生物胞素,反应中心是生物素中的 N-1

丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)以生物素为辅基,催化丙酮酸结合一分子二氧化碳(生理条件下表示为 HCO_3^-)羧化生成草酰乙酸,反应中酶-生物素作为转移羧基的中间载体(图 5.14)。

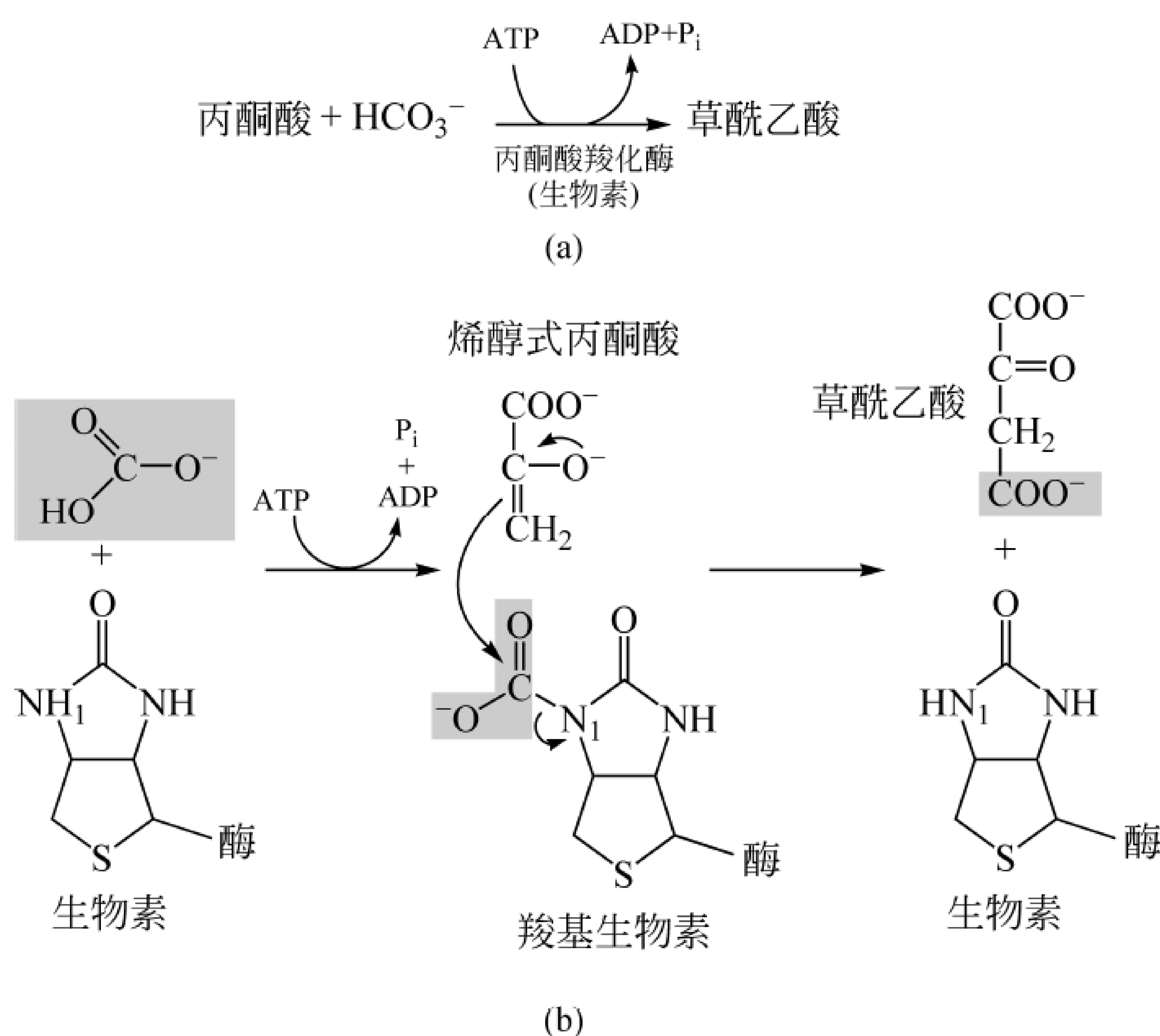


图 5.14 丙酮酸羧化酶催化的反应

(a) 丙酮酸羧化酶反应;(b) 生物素作为辅基在反应中的作用,烯醇式丙酮酸是丙酮酸的异构式

生物素(曾经称为维生素 H)主要由肠道细菌合成,每天的需要量很少(μg 量),正常饮食完全可以满足。不过经常食用生鸡蛋可能会导致生物素缺乏,因为蛋清中含有一种由 4 个相同亚基组成的四聚体抗生物素蛋白(avidin),蛋白中每个亚基都可紧密结合一个生物素,阻止了对生物素的吸收。煮熟的鸡蛋使抗生物素蛋白变性,失去了对生物素的亲和力,也就消除了它的毒性。

实验室常利用抗生物素蛋白能够紧密结合生物素的特点,利用固定了抗生物素蛋白的亲和层析柱通过亲和层析可以从混合物中提取共价结合生物素的物质。

5.8 四氢叶酸

辅酶四氢叶酸(tetrahydrofolic acid,THFA,或 THF,或 FH_4)是叶酸(folate)(维生素 B_9)的衍生物。叶酸也称为蝶酰谷氨酸(pteroylglutamate),由蝶呤(2-氨基-4-氧取代蝶啶)、对氨基苯甲酸和谷氨酸残基构成(图 5.15)。

四氢叶酸是通过在蝶呤环的 5、6、7 位和 8 位加氢由叶酸合成的,在两步依赖 NADPH 的反应中经二氢叶酸还原酶催化,叶酸被还原生成四氢叶酸(图 5.16)。

四氢叶酸在代谢中主要作为一碳单位的供体,一碳单位包括甲基、亚甲基或甲酰基等基团,一般结合在四氢叶酸的 N_5 或 N_{10},或同时结合在 N_5 和 N_{10} 上(图 5.17)。例如,在以四氢叶酸为辅酶的胸苷酸合酶催化下由 dUMP(脱氧尿嘧啶核苷酸)合成 dTMP(胸苷酸)的反应中,四氢叶酸提供一碳单位甲基。

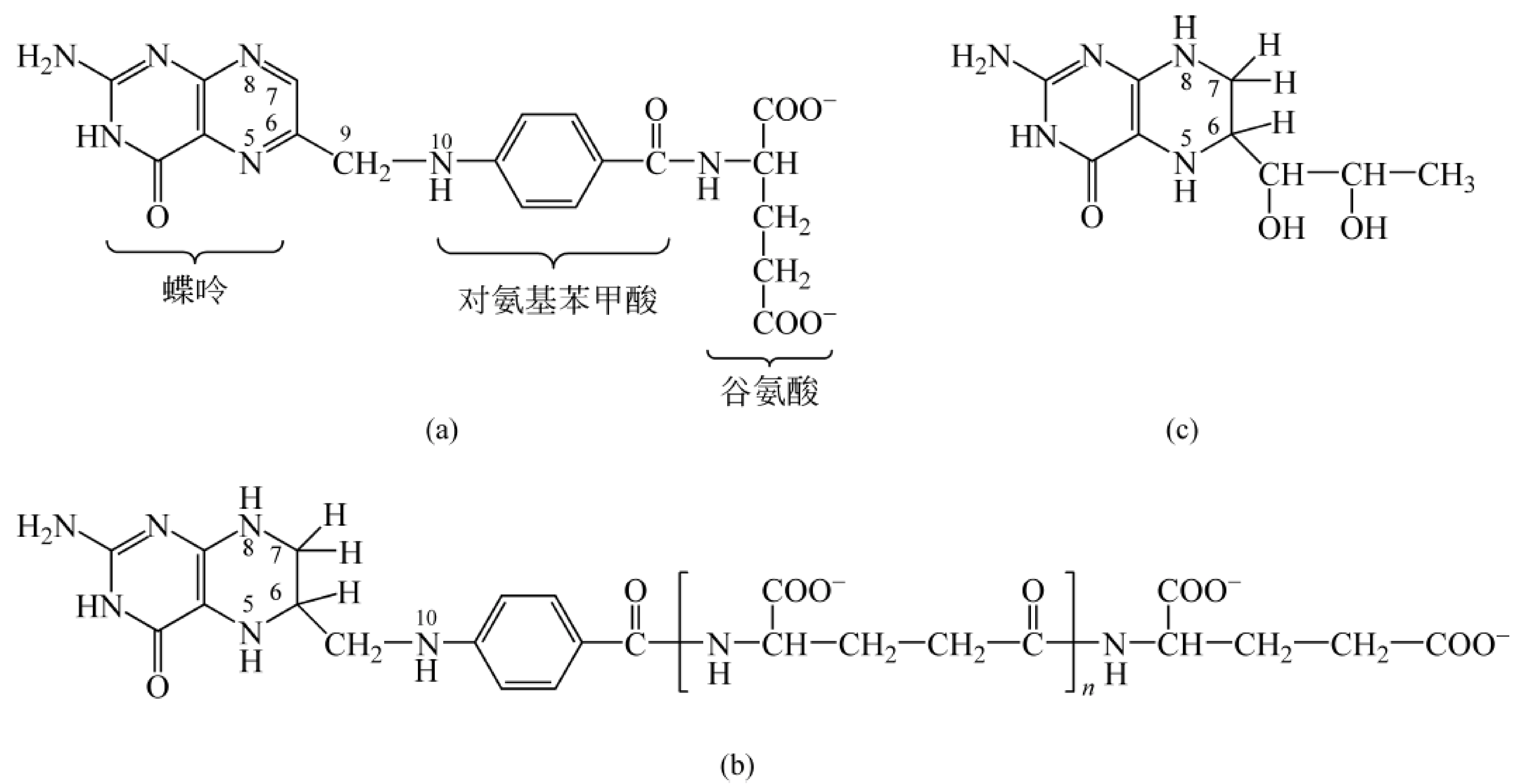


图 5.15　叶酸和四氢叶酸

(a) 叶酸;(b) 四氢叶酸,含有5～6个谷氨酸残基,反应中心是N-5和N-10;(c) 四氢生物蝶呤

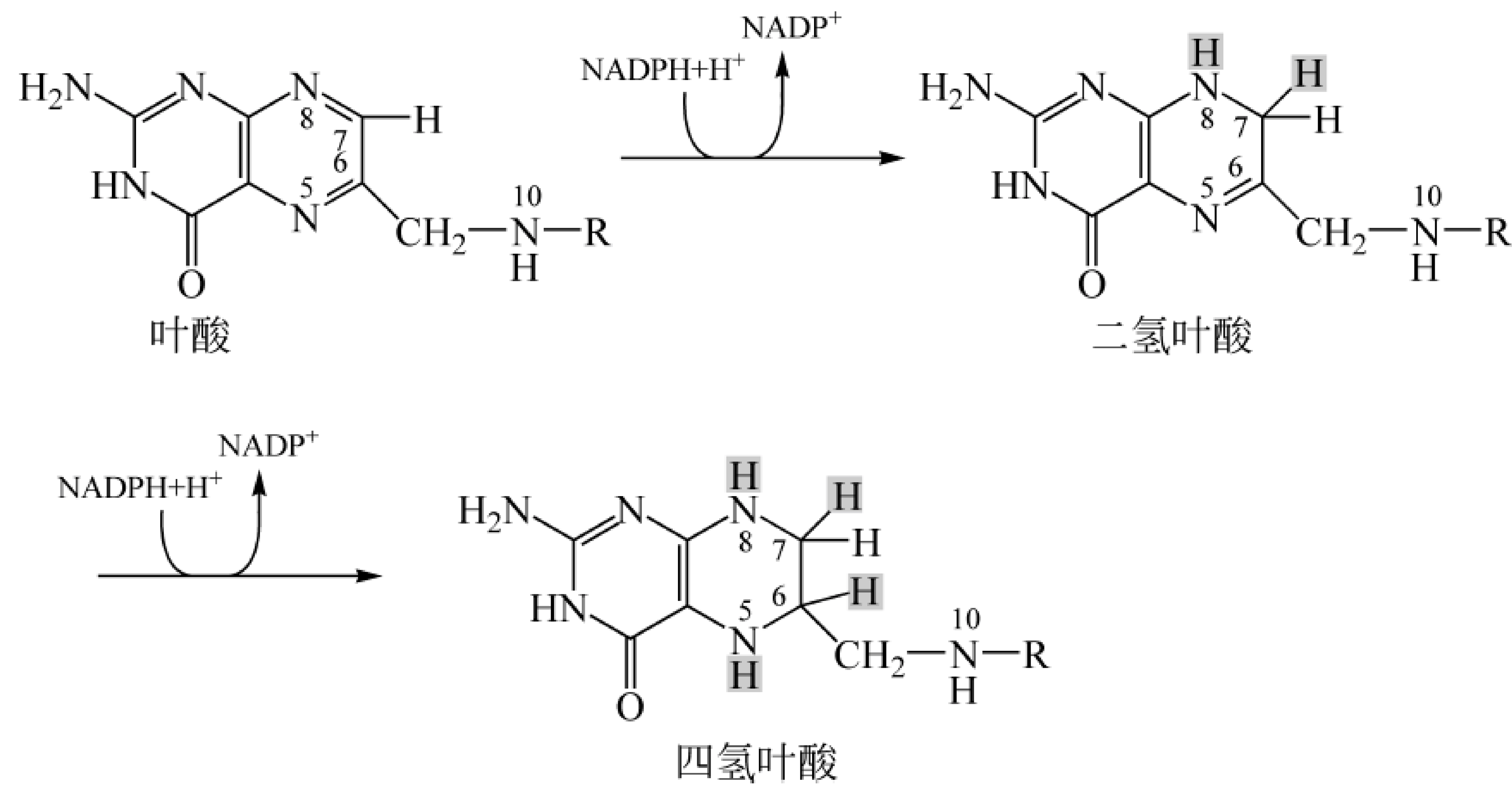


图 5.16　四氢叶酸生物合成反应

R为侧链基团

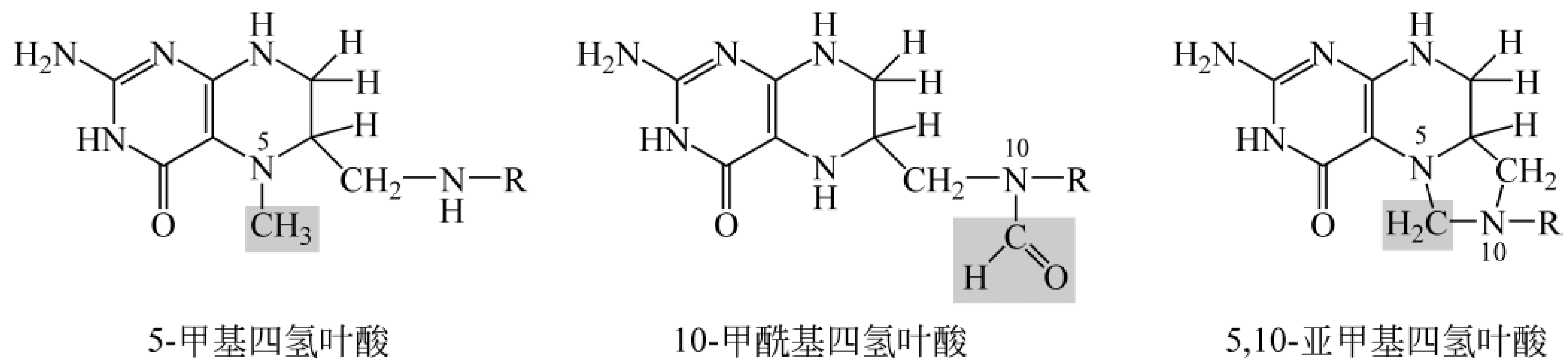


图 5.17　四氢叶酸的几种一碳单位衍生物

图中只给出了四氢叶酸结构中蝶呤部分的结构,R代表其余部分

许多蔬菜和水果都含有叶酸，所以叶酸缺乏即使在发展中国家的成人和儿童也很少见，但在怀孕的妇女中却时有发生叶酸缺乏的情况。四氢叶酸缺乏可能会导致贫血，有时会严重影响胎儿发育。因此，孕妇要注意补充叶酸，以确保她们自身和胎儿的健康。

5.9　腺苷钴胺素和甲钴胺素

腺苷钴胺素（adenosylcobalamin）和甲钴胺素（methylcobalamin）是维生素 B_{12}（钴胺素，cobalamin）的衍生物，两者的区别在于与钴原子轴向配位的分别为 5′-脱氧腺苷基和甲基（图 5.18）。维生素 B_{12}结构中的咕啉环系统类似于血红素中的卟啉环系统。

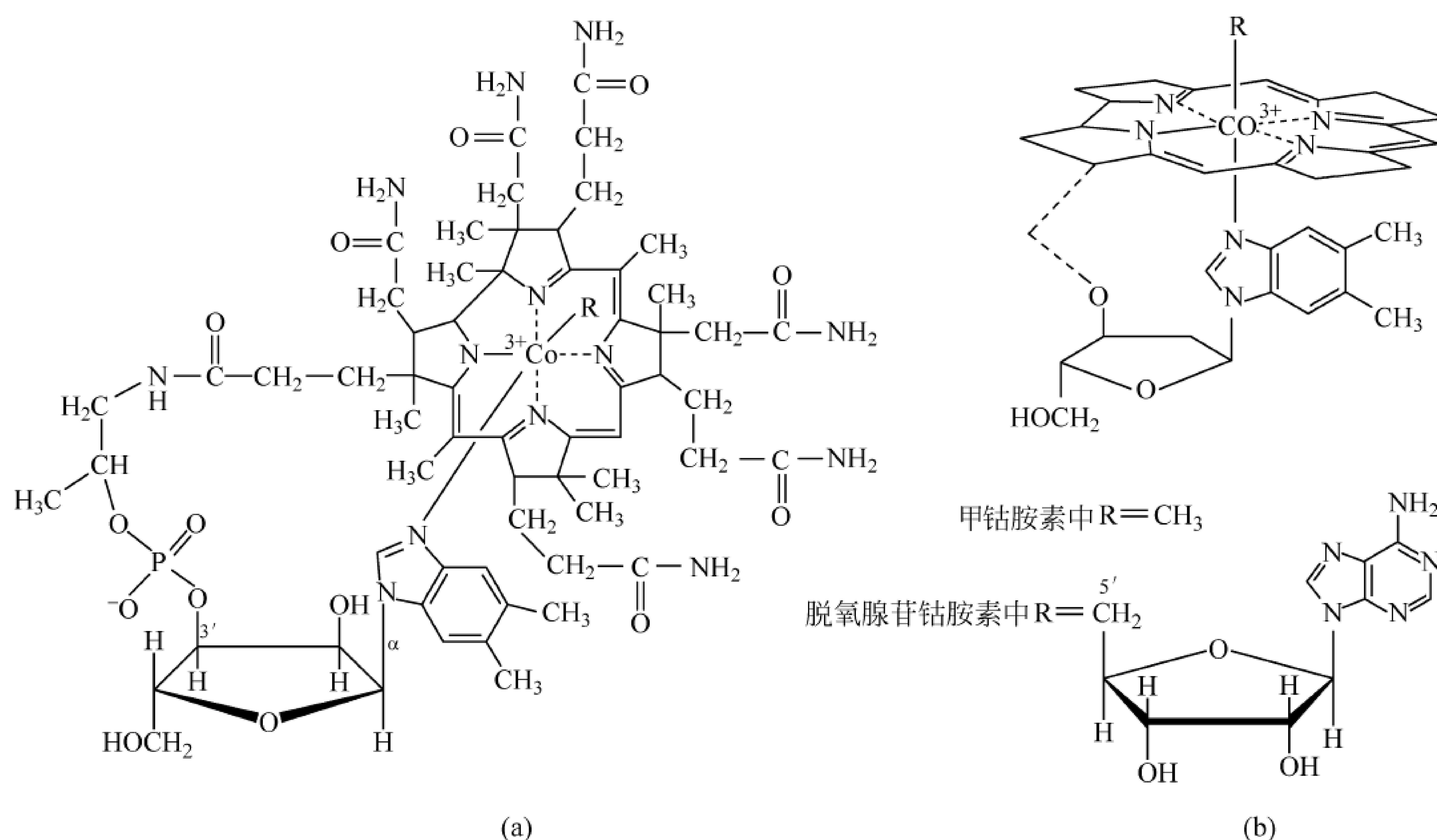


图 5.18　维生素 B_{12}和它的辅酶

（a）维生素 B_{12}结构；（b）维生素 B_{12}辅酶简图，苯并咪唑核糖核苷酸位于咕啉环下方，而 R 基团位于环的上方，在甲钴胺素中 R 为甲基，在脱氧腺苷钴胺素中 R 为 5′脱氧腺苷

植物和动物都不能合成维生素 B_{12}，只有少数微生物能够合成。食草动物胃中含有可以合成维生素 B_{12}的微生物。食肉动物所需维生素 B_{12}是从食物中获得的，吸收的大多数维生素 B_{12}都是经过酶催化还原和与 ATP 反应形成的腺苷基辅酶衍生物。腺苷钴胺素中 5′-脱氧腺苷基成分通过稀少的 C-5′—Co 键与钴连接，如果换成—CN 或—CH_3 或—OH，则生成相应的氰钴胺素、甲钴胺素或羟钴胺素。

腺苷钴胺素参与几种酶催化的分子内重排，例如在依赖于腺苷钴胺素的甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶催化下，分子内发生重排反应，甲基丙二酸单酰 CoA 转换为琥珀酰 CoA（图 5.19）。

另外，甲钴胺素还与四氢叶酸一起参与甲基的转移，例如在哺乳动物中，在同型半胱氨酸甲基转移酶的催化下由同型半胱氨酸可生成蛋氨酸（图 5.20）。在该反应中 5-甲基四氢叶酸提供甲基给维生素 B_{12}形成甲基钴胺素（图中 CH_3—B_{12}），甲钴胺素再将甲基转到同型半胱氨酸侧链巯基上生成蛋氨酸。

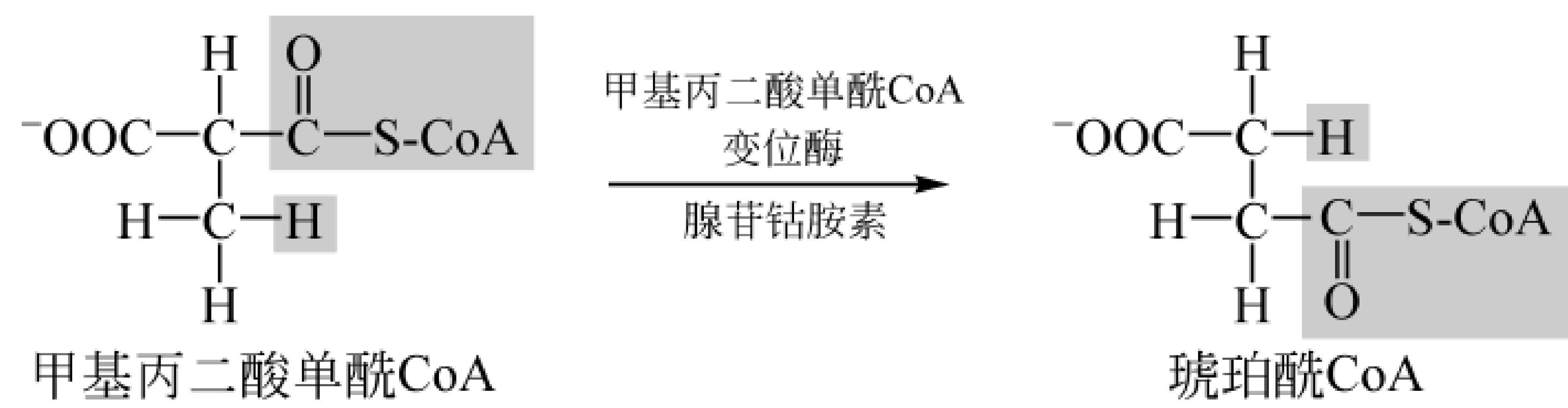


图 5.19 分子内重排反应

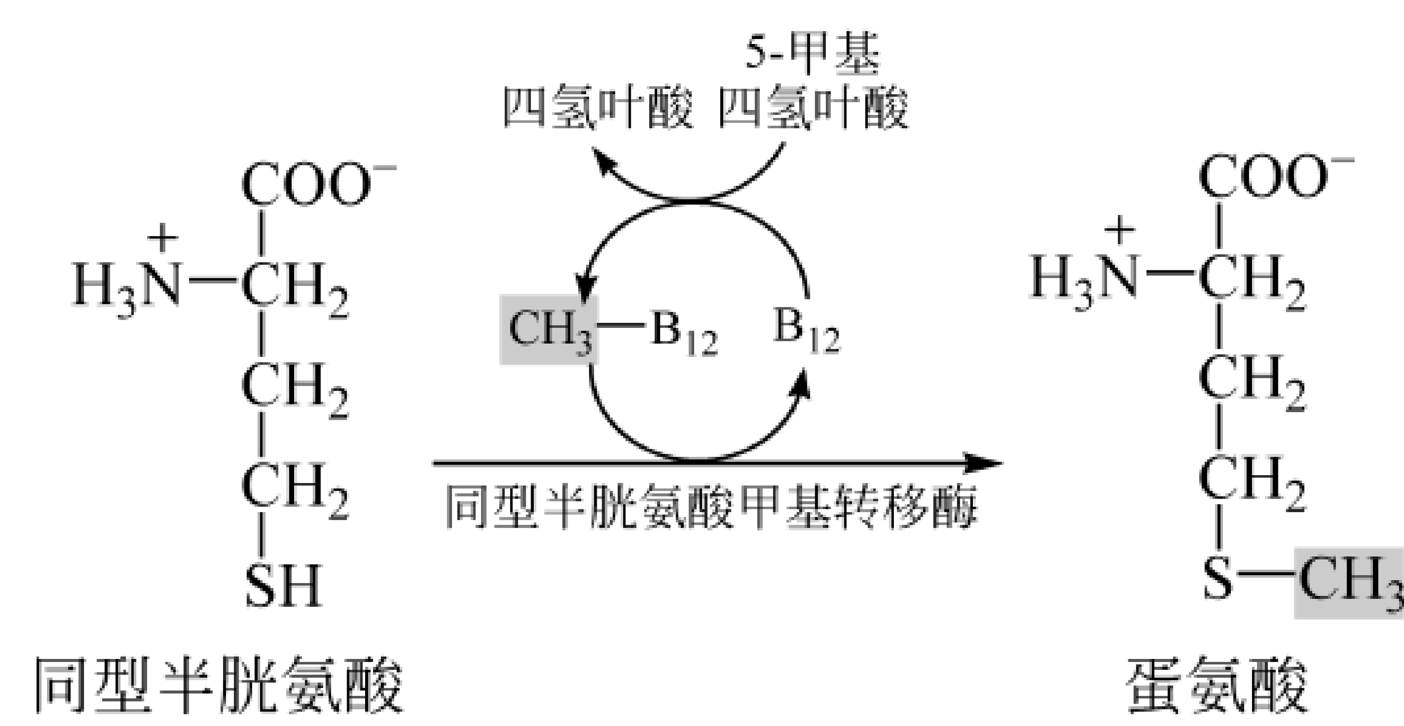


图 5.20 由同型半胱氨酸生物合成蛋氨酸

5.10 硫辛酰胺

辅酶硫辛酰胺实际上是硫辛酸与蛋白质结合的形式。硫辛酸常与B族维生素列在一起,然而它只是少数微生物生长需要的,动物似乎可以由前体合成它。图5.21给出了硫辛酸和硫辛酰胺结构。硫辛酸没有游离形式,而是通过它的羧基与蛋白质中一个赖氨酸残基的ε-氨基形成的酰胺键结合在蛋白质上。

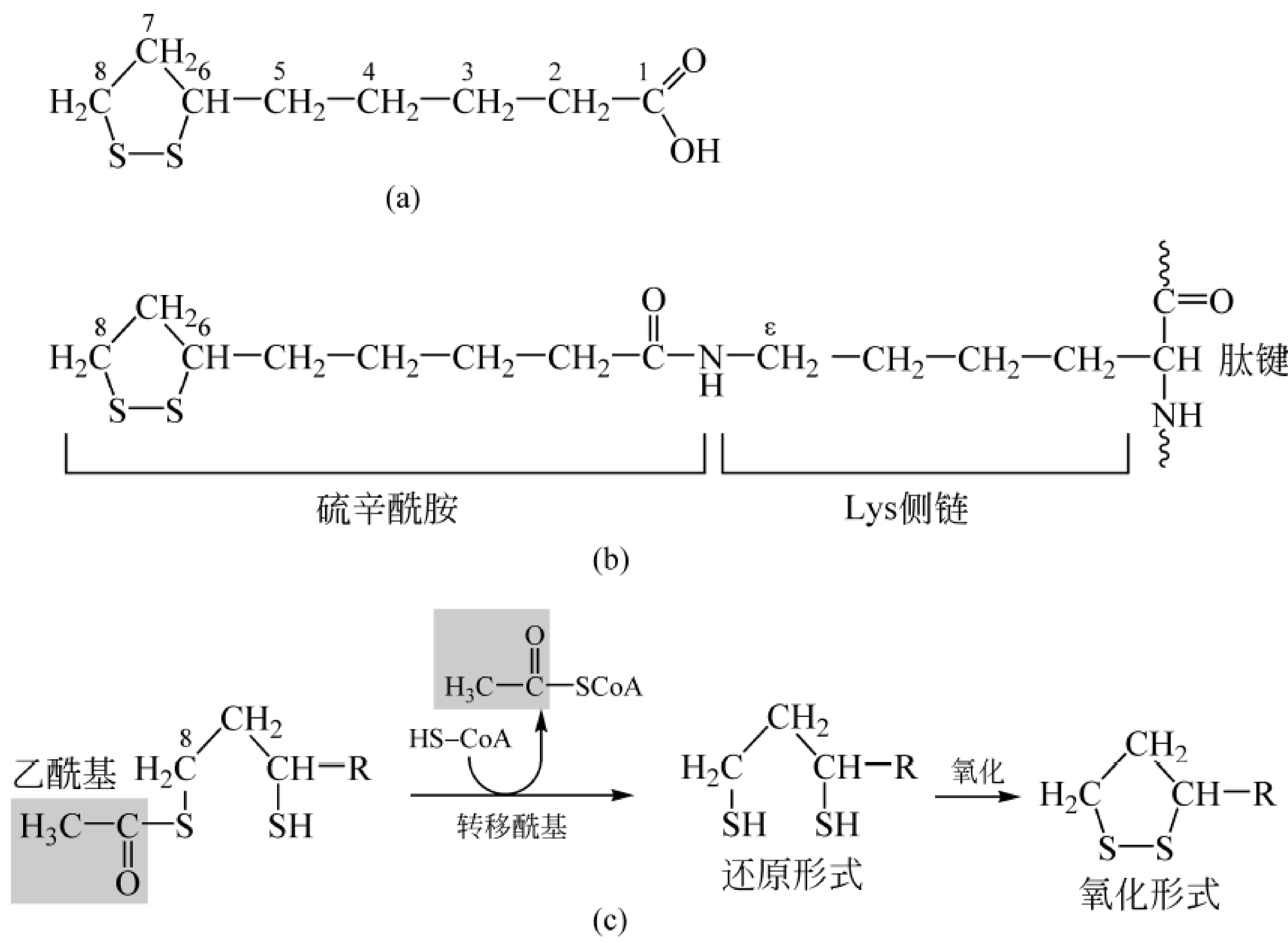


图 5.21 硫辛酸和硫辛酰胺

(a) 硫辛酸;(b) 硫辛酰胺;(c) 硫辛酰胺在丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应中的作用

硫辛酰胺作为酶的辅基主要出现在柠檬酸循环中丙酮酸脱氢酶复合物和α-酮戊二酸脱氢酶复合物中的二氢硫辛酰胺转移酶中，携带着酰基像一个长臂一样摆动于多酶复合物中的活性部位之间。例如在丙酮酸脱氢酶复合物的催化反应中，硫辛酰胺首先接收来自丙酮酸脱羧后的乙酰基，然后将乙酰基转移给 CoA（生成乙酰 CoA）后，变成还原型，再经过氧化又恢复到原来的氧化型，准备进行下一轮反应[图 5.21(c)]。

5.11　维生素 C

维生素 C 也称为抗坏血酸（ascorbic acid），是个具有五元环的不饱和内酯，被氧化（在空气中就可被氧化）就会丧失维生素 C 的活性，变成了它的脱氢氧化形式——脱氢抗坏血酸（图 5.22）。现在研究表明抗坏血酸不是辅酶，但可作为还原剂参与一些酶催化的反应，其中最重要的反应是胶原的羟化。

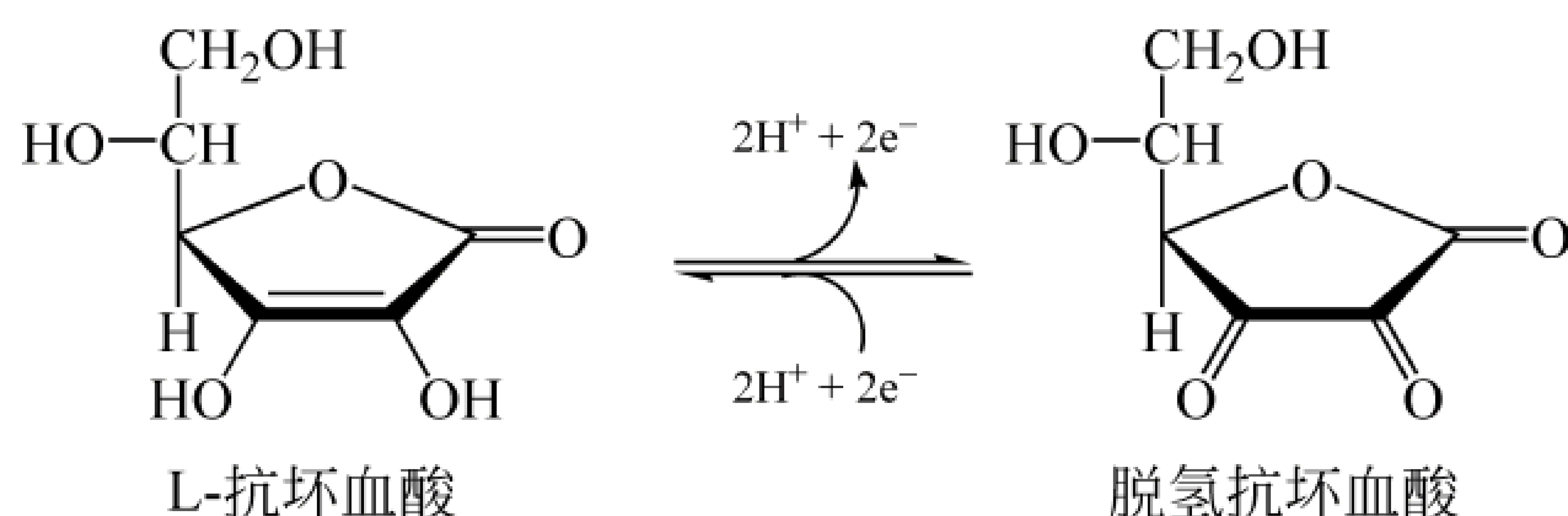


图 5.22　抗坏血酸和脱氢抗坏血酸

维生素 C 之所以称为抗坏血酸是因为它具有防治坏血病（scurvy）（维生素 C 缺乏症）的功能，此外还具有通过维持酶分子的—SH，使体内各种含巯基的酶保持活性，清除自由基和阻断致癌物 *N*-亚硝基化合物合成预防癌症；通过维持谷胱甘肽的还原状态，使得谷胱甘肽与一些重金属，如 Hg^{2+}、Pb^{2+} 等结合并排出体外达到解毒的作用等。

维生素 C 可以由葡萄糖经 4 步酶催化反应合成（图 5.23）。很多动物都可合成维生素 C，但豚鼠及包括人在内的灵长类动物不能合成，因为他们缺少古洛糖酸内酯氧化酶，不能完成第 4 步反应，需要由外源食物供给。

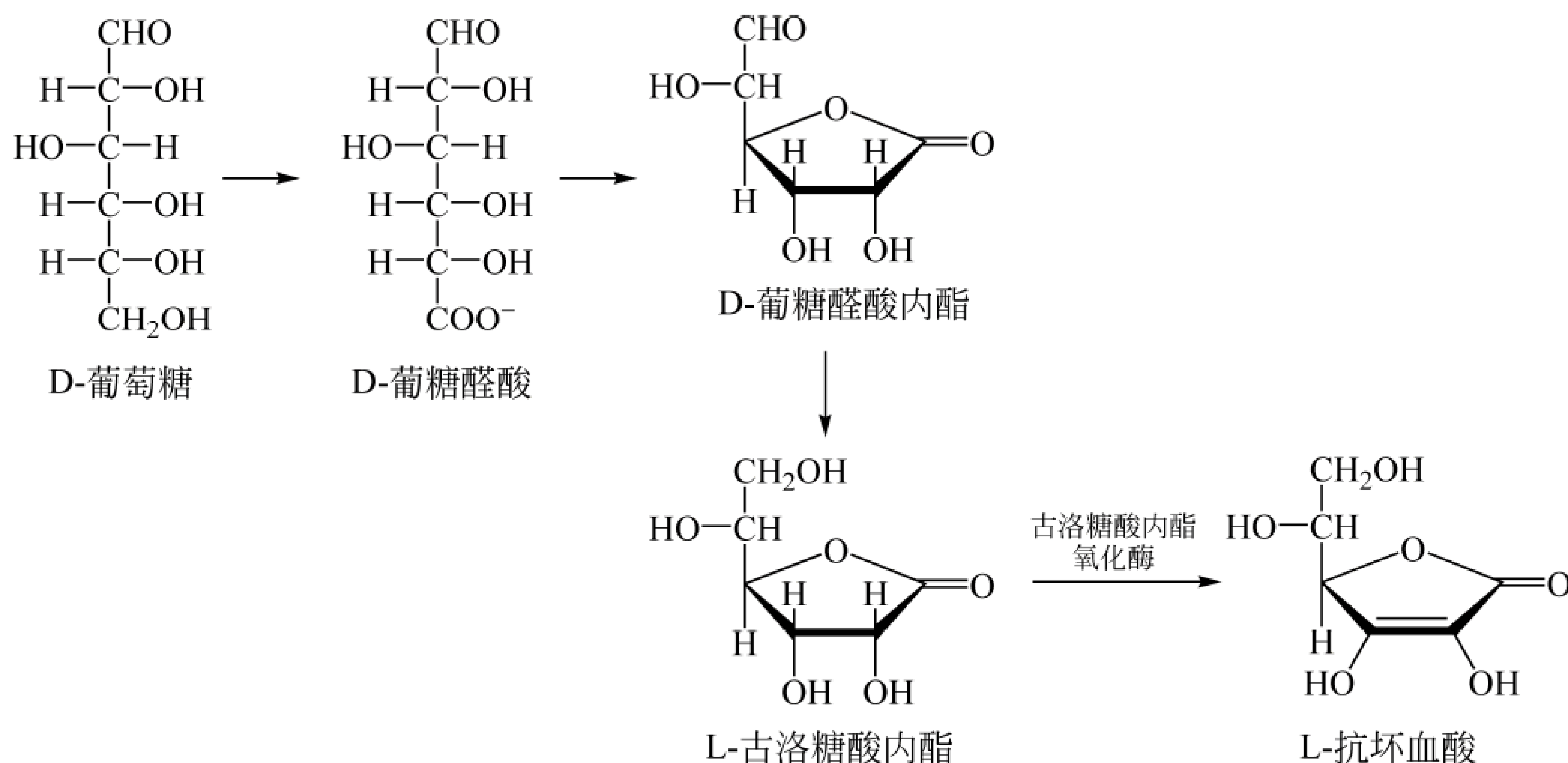


图 5.23　维生素 C（抗坏血酸）的生物合成

5.12 脂溶性维生素

脂溶性维生素(lipid vitamins)包括维生素A、维生素D、维生素E和维生素K,这4种维生素尽管每一种都至少含有一个极性基团,但都是高度疏水的。某些脂溶性维生素并不是辅酶的前体,但它们不用进行化学修饰就可直接被生物体利用。

1. 维生素A

维生素A,也称为视黄醇(retinol),是一个20碳脂类分子,可由饮食中的40碳β-胡萝卜素(β-carotene)通过酶促氧化裂解获得,或是直接从肝、蛋黄或奶制品中获得,胡萝卜和深色蔬菜都富含β-胡萝卜素(图5.24)。由于末端功能基团的氧化态不同,维生素A存在3种形式:视黄醇(—CH_2OH)、视黄醛(retinal)(—CHO)和视黄酸(retinoic acid)(—COOH)。

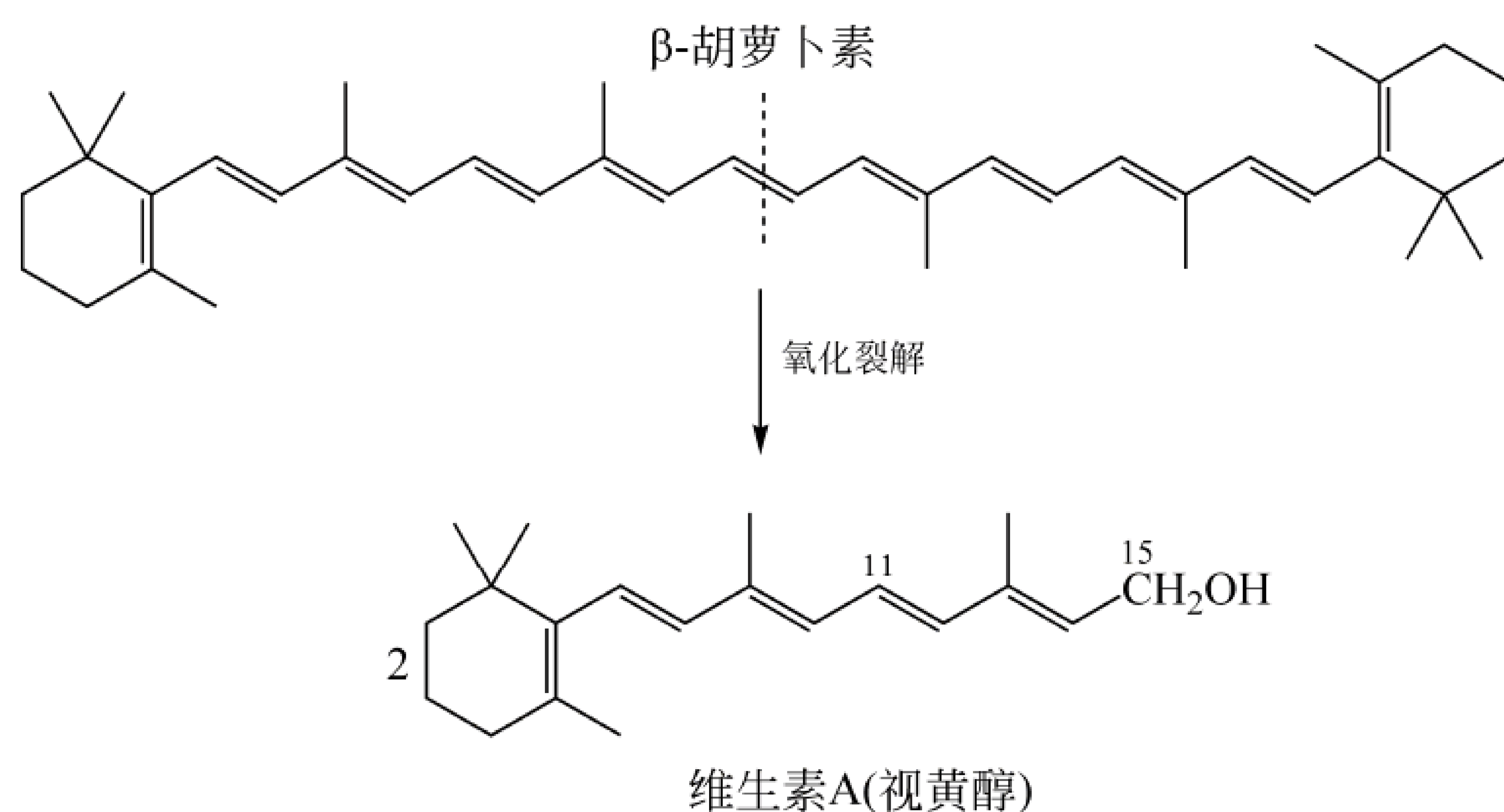


图5.24 维生素A的生成

3种维生素A衍生物都具有重要的生物学功能。视黄醛是一个光敏感化合物,在视觉中起着重要作用。它是蛋白视紫红质(rhodopsin)的辅基,通过它吸收光触发神经脉冲。视黄酸是一个可以结合细胞内受体蛋白的信号化合物。配体-受体化合物与染色体结合,可以在细胞分化时调控基因表达。

据报道维生素A缺乏不仅导致包括夜盲症在内的视觉障碍,而且还会影响生长发育和生殖功能等。

2. 维生素D

维生素D主要指的是维生素D_3(胆钙化醇,cholecalciferol)和维生素D_2(麦角钙化醇,ergocalciferol)。当人体暴露于充足阳光下时,在皮肤内由7-脱氢胆固醇不经酶催化就可形成维生素D_3,再经两次羟化反应就可转化为它的活性形式1,25-二羟胆钙化醇(图5.25)。维生素D_2也以类似方式被激活。实际上这两种活性形式化合物是激素,可以帮助人体调控Ca^{2+}的利用和它在骨骼中的沉积。

在维生素D缺乏病中,例如儿童中的维生素D缺乏症(佝偻病)和成人中的骨质疏松,骨质弱都是由于磷酸钙不能在骨骼的胶原基质中形成合适的结晶导致的。维生素D可由食物中获得,例如牛奶、动物肝、蛋黄和鱼肝油中都含有维生素D,其中尤以鱼肝油中含量最丰富。

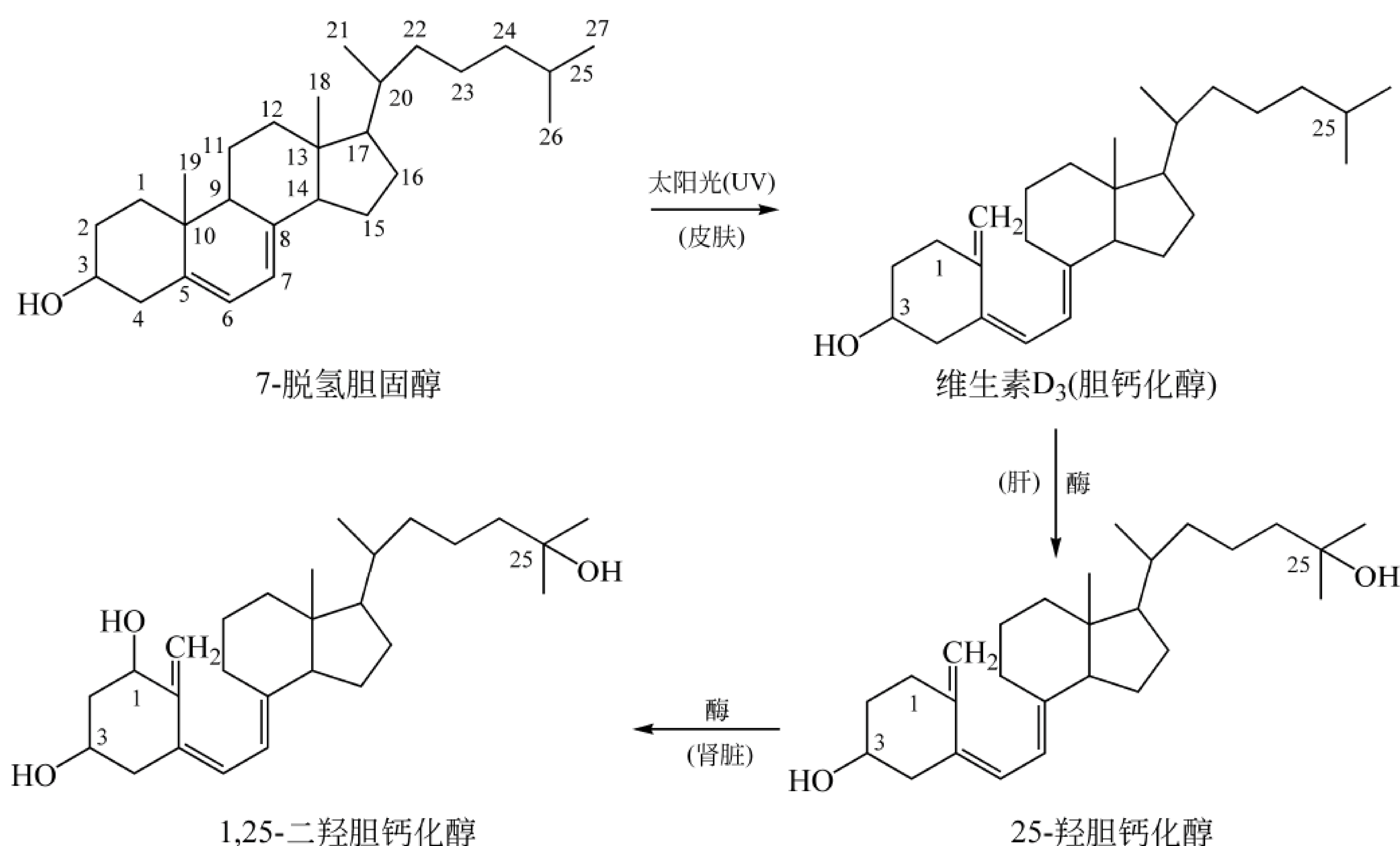


图 5.25 维生素 D_3 和 1,25-二羟胆钙化醇

3. 维生素 E

维生素 E 与动物生育有关,如果缺乏会导致不育,所以维生素 E 也称为生育酚(tocopherols)。天然存在的生育酚有 8 种,这一组化合物都含有一个含氧的双环系统,环上带有一个疏水侧链,其中尤以 α-生育酚生理活性最高(图 5.26)。

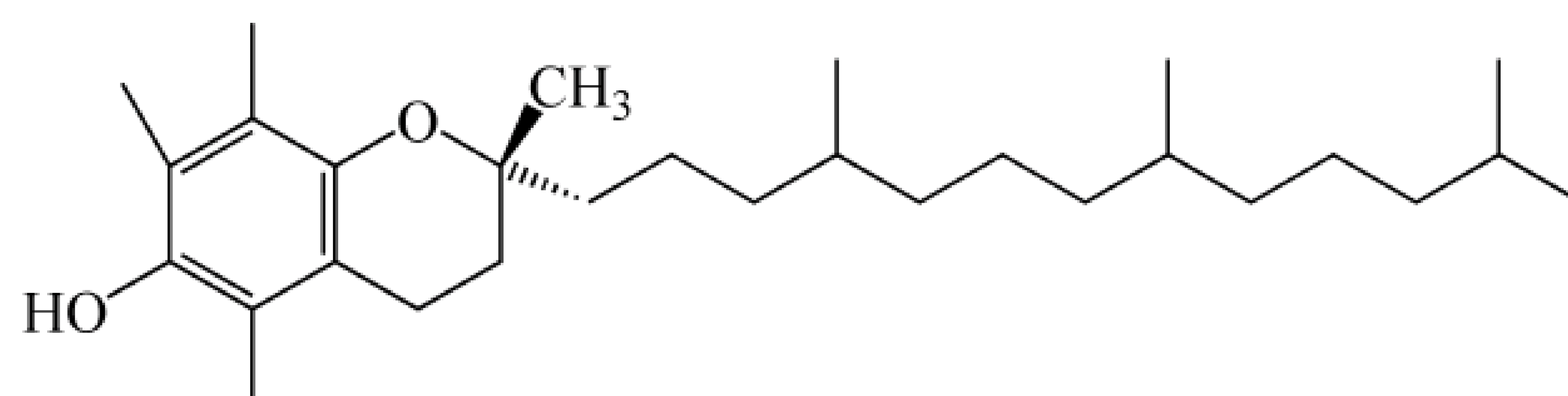


图 5.26 维生素 E(α-生育酚)结构

临床上维生素 E 常用作预防流产的保胎药,此外维生素 E 作为还原剂还起着清除自由基的作用,防止生物膜中脂肪酸受到氧化伤害。维生素 E 缺乏病很少见,如缺乏除了导致不育之外,还可能导致红细胞变脆和神经损伤。

4. 维生素 K

维生素 K(叶绿醌,phylloquinone)是一种来自植物的脂溶性维生素,人体肠道细菌也可合成维生素 K(图 5.27)。维生素 K 作为还原剂参与羧化酶催化的羧化反应,主要功能是促进凝血。羧化酶在肝内合成凝血酶原时催化凝血酶原上特殊的谷氨酸残基转化为 γ-羧基谷氨酸残基。γ-羧基谷氨酸成分起着 Ca^{2+} 螯合剂的作用。钙离子与凝血酶原上的 γ-羧基谷氨酸残基结合触发血液凝固级联反应。

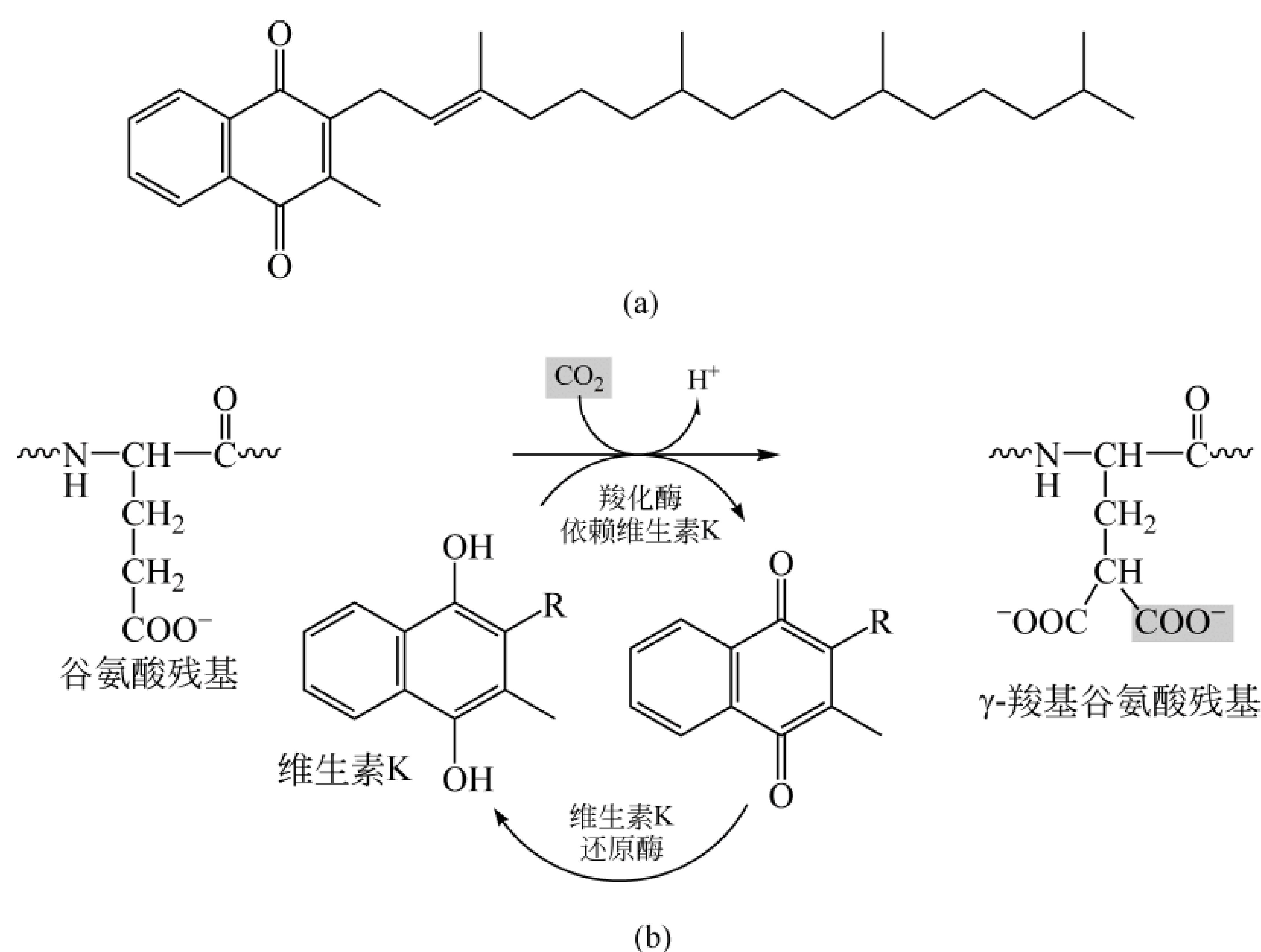


图5.27　维生素K

(a)维生素K(叶绿醌)的结构;(b)维生素K作为还原剂参与羧化酶催化的羧化反应

相关话题　维生素补品对运动成绩的提高是否有益

可以毫不夸张地讲绝大多数运动员都摄入营养素补品,其中包括一些世界级运动员,他们都期待着营养素能提高他们的运动成绩。营养素补品包括维生素、矿物质和蛋白粉等。本章描述的是维生素,让我们来看看额外的维生素补品是否能够帮助运动员提高运动成绩。

维生素B_1(硫胺素)、维生素B_2(核黄素)和烟酸(尼克酸)这3种维生素在能源释放中起关键作用。正常饮食就能提供所需的这3种维生素,额外补加并不能增加竞技优势。事实上过量烟酸还会对成绩有相反影响。因为过量烟酸会在运动时抑制脂肪酸释放,从而迫使肌肉利用糖原,结果导致糖原被更快地用尽,可能使运动更加困难。

维生素B_6在营养素释放能量、糖原释放葡萄糖和血红蛋白形成时起着关键作用,一些销售商声称维生素B_6药丸能提高运动成绩,但是科学研究证明并非如此。为了保证饮食中含有足够的维生素B_6,人们只需食用一些绿色蔬菜、肉、鱼、豆类、水果和谷类就够了。大量的维生素B_6并没有额外好处,反而有害。

增加维生素B_{12}能提高运动成绩的信念可能源自于维生素B_{12}在红细胞生成中所起的作用。维生素B_{12}缺乏是会引起贫血,但一个营养良好的运动员是不会缺乏B_{12}的,认为赛前服用或注射维生素B_{12}对提高成绩有益是基于心理上,而非生理上需要。

维生素C和维生素E是公认的抗氧化剂,在进行持续高强度体力活动时,肌肉的氧耗增长10倍以上,这会使得体内有害的自由基产量增多。许多运动员服用抗氧化剂,尤其是维生素E,希望能阻止肌肉的氧化损伤。尽管研究结果显示补充维生素C和维生素E对运

动所诱生的氧化应激起到保护作用，却没有证据表明补充它们能提高运动成绩。

到目前为止，研究表明除了维生素 C 和维生素 E 的抗氧化作用以外，补充维生素对运动的机体没有什么益处。

小结

1. 吡啶核苷酸 NAD^+ 和 $NADP^+$ 都是脱氢酶的辅酶，从特定底物转移氢负离子（H^-）使 NAD^+ 或 $NADP^+$ 分别还原为 NADH 或 NADPH，并释放出一个 H^+。

2. 维生素 B_2（核黄素）的辅酶形式 FAD 和 FMN 作为辅基与酶紧密结合，FAD 和 FMN 可通过氢负离子转移（两个电子）分别被还原形成 $FADH_2$ 和 $FMNH_2$。还原的黄素辅酶一次可贡献一个或两个电子。

3. 辅酶 A 是泛酸的衍生物，参与酰基转移反应。如脂肪酸合成中就需要酰基载体蛋白。

4. 维生素 B_1（硫胺素）的辅酶形式是硫胺素焦磷酸（TPP），TPP 噻唑环与一个 α-酮酸底物脱羧时生成的醛结合。

5. 吡哆醛磷酸（PLP）是氨基酸代谢中许多酶的辅基。例如作为转氨酶辅基参与转氨反应。

6. 生物素是羧化酶和羧基转移酶的辅基，它通过共价键连接在酶活性部位的赖氨酸残基上。

7. 四氢叶酸是叶酸的还原型衍生物，参与甲醇、甲醛和甲酸氧化水平的一碳单位的转移。

8. 维生素 B_{12}（钴胺素）的辅酶形式是腺苷钴胺素和甲钴胺素，含有钴和咕啉环系统。它们参与分子内的重排和甲基化反应。

9. 硫辛酰胺是 α-酮酸脱氢酶多酶复合物的一个辅基，接收酰基形成硫酯。

10. 维生素 C 是一个维生素，但不是辅酶。它是几种反应的底物，例如胶原合成中就需要它。

11. 维生素 A 与视觉有关，还具有促进生长发育和维护生殖功能的作用；维生素 D 参与骨骼生长发育，可以调节 Ca^{2+} 的利用；维生素 E 与生育有关，还具有抗氧化作用；维生素 K 参与凝血酶原合成，促进凝血。

习题

1. 列出反应中起着下列作用的辅酶：(a)作为氧化还原试剂；(b)作为酰基载体；(c)转移甲基；(d)转移氨基；(e)参与羧化或脱羧反应。

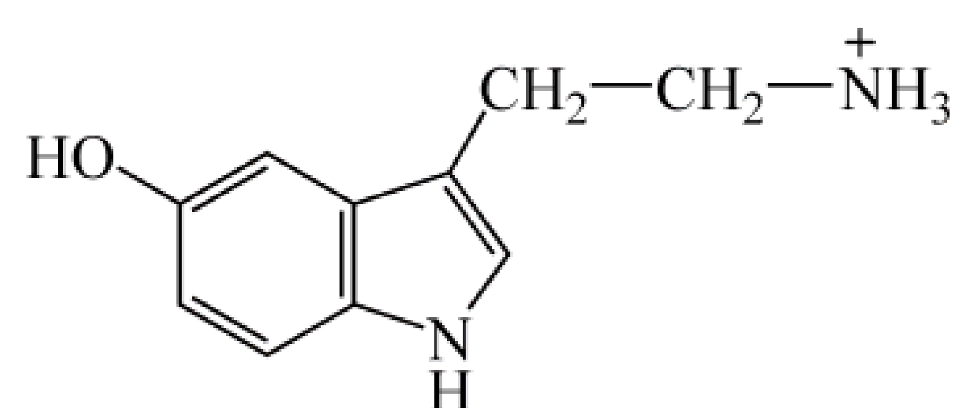
2. 20 世纪初，癞皮病在美国南部流行，当时的膳食以玉米为主食。研究发现该病不是病毒感染，也不是毒素中毒引起的。后来发现患癞皮病的病人多喝点牛奶或多吃点肉，病情大为好转，这是什么道理？

3. 乳酸脱氢酶催化乳酸氧化为丙酮酸(NAD^+为辅酶),由乳酸转移双电子过程中NAD^+被还原。同时从乳酸除去了两个质子,是否应当将辅酶的还原形式正确地写成$NADH_2$呢?请解释。

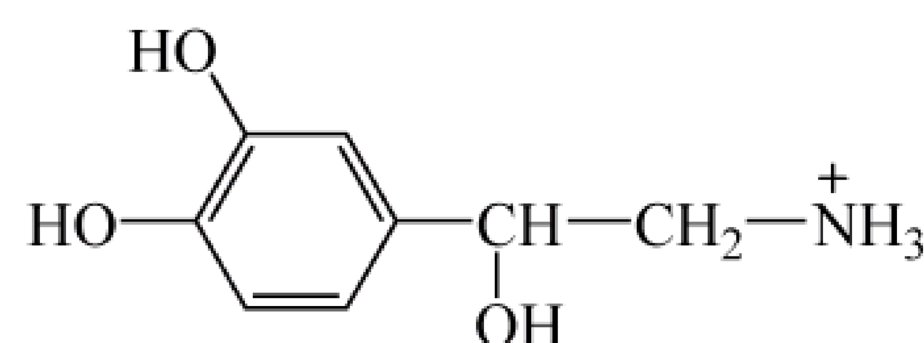
4. 当将从猪肌肉中纯化的乳酸脱氢酶装入到一个透析袋(只允许小分子透过膜)对水透析后,酶几乎没有催化活性了,这是什么原因?有什么办法可以使该酶恢复活性?

5. 如果只给鸽子饲喂精白米和水,数天后逐渐发现鸽子无法维持身体平衡,总要向后仰。如果继续下去会导致死亡。此时如果在饲料中拌点米糠,则此症状可以防止或改善。你能解释这个现象吗?

6. 人如果缺乏维生素B_6有可能导致易怒、神经过敏、抑郁和惊厥。这些症状可能是由于神经递质5-羟色胺(色氨酸衍生物)和去甲肾上腺素(酪氨酸衍生物)水平降低引起的。维生素B_6缺乏怎么会引起它们水平降低呢?



5-羟色胺



去甲肾上腺素

7. 巨红细胞性贫血是由于DNA合成速度降低导致生成的成熟红细胞减少的一种疾病。红细胞非正常的大,并且很容易破裂。研究表明该疾病是由于叶酸缺乏引起的,请解释。

8. 肾性骨发育不全,或称肾性佝偻症,主要是骨骼矿物质排除过多引起的。即使给予肾病患者均衡的饮食,仍然会有肾性骨发育不全发生。请问:(a)哪一种维生素与骨骼矿物质化有关?(b)为什么肾受损会造成骨骼矿物质排出过多?

9. 有的保健食品广告宣称从自然界提取的维生素要比化学合成的更安全。例如从蔷薇中提取的纯*L*-抗坏血酸(维生素C)比化学合成的更好。你认为两种来源的同一种维生素会有不同吗?身体能区分哪个来源于天然,哪个来自化学合成吗?

10. 将哺乳动物肝脏样品在三氯甲烷和水的混合物中匀浆,维生素A、维生素B_6、维生素C和维生素D各分布在哪一相中?

6 糖

糖常称为“碳水化合物”(hydrate of carbon),源于经验化学式$(CH_2O)_n$,糖被认为是C和H_2O的化合物,大部分糖符合这个分子式。糖是自然界分布最广泛,地球上含量最丰富的一类生物有机分子。一些生物通过光合作用将太阳能转化为化学能,利用化学能将大气中的二氧化碳转变为糖。

糖分为单糖、寡糖和多糖。单糖(monosaccharide)是寡糖和多糖构件单位,$(CH_2O)n$中的n为3或大于3(n通常为5或6,但也可达到9)。寡糖(oligosaccharide)是2～20个单糖的聚合物,而多糖 (polysaccharide)中单糖数目都大于20。寡糖和多糖不能用经验式表示。

6.1 单糖

单糖是水溶性、白色、带有甜味的结晶固体。例如日常食用的葡萄糖和果糖。从化学角度讲单糖是多羟基的醛(aldoses,醛糖)或多羟基的酮(ketoses,酮糖)。最小的单糖是三碳醛糖甘油醛(glyceraldehyde)和三碳酮糖二羟丙酮(dihydroxyacetone)。甘油醛是个手性分子,存在*L*-甘油醛和*D*-甘油醛两个立体异构体。二羟丙酮没有不对称碳,是非手性分子(图6.1)。

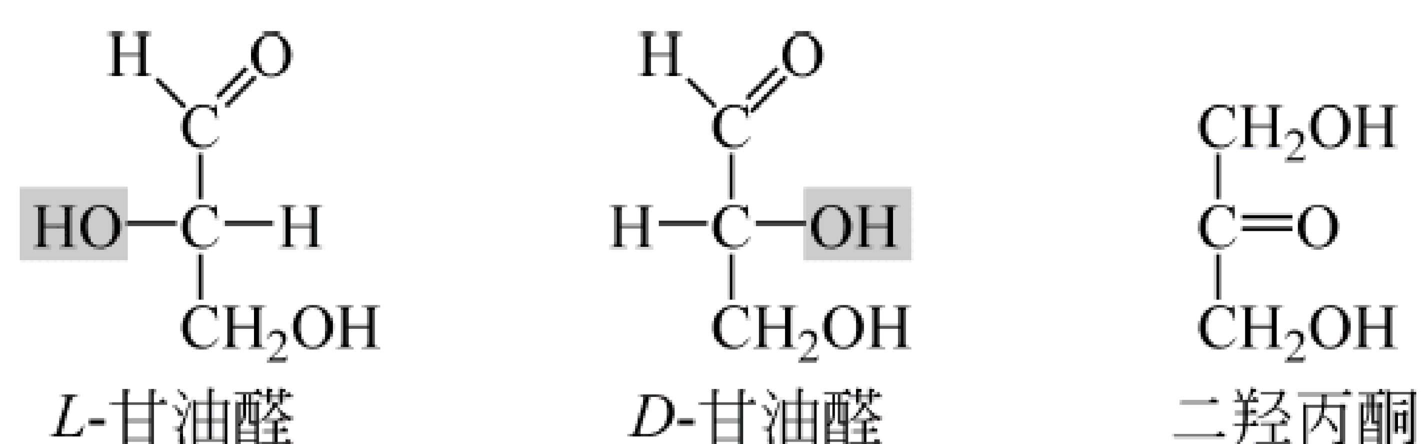


图6.1 甘油醛和二羟丙酮

Fischer投影式

6.1.1 醛糖和酮糖

碳链比较长的醛糖和酮糖都可看作是一个手性的H—C—OH分别插入到甘油醛和二羟丙酮的羰基和伯醇基之间的延长产物。

1. 醛糖

图6.2给出了在*D*-甘油醛基础上形成的丁醛糖(四碳醛糖)、戊醛糖(五碳醛糖)和己醛糖(六碳醛糖)一系列醛糖的名称和结构。其中的许多单糖大多数生物(体)都不能合成。

碳原子的编号是从羰基碳(编号为1)开始的,按照惯例,*D*型糖是具有最高编号的手性碳原子(离羰基碳最远的手性碳)上连接的—OH(图中阴影OH)在Fischer投影式中朝向右的糖,朝向左的就是*L*型糖了。

丙醛糖

D-甘油醛

丁醛糖

D-赤藓糖　D-苏糖

戊醛糖

D-核糖　D-阿拉伯糖　D-木糖　D-来苏糖

己醛糖

D-阿洛糖　D-阿卓糖　D-葡萄糖　D-甘露糖　D-古洛糖　D-艾杜糖　D-半乳糖　D-塔罗糖

图 6.2　三碳至六碳 D-醛糖的结构

像 *D*-甘油醛那样,图 6.2 中从 *D* 型四碳醛糖到 *D* 型六碳醛糖中的任一个糖都存在着与它们呈镜像关系的 *L* 型醛糖。例如图 6.3 表示的就是呈镜像关系的 *D*-葡萄糖和 *L*-葡萄糖。

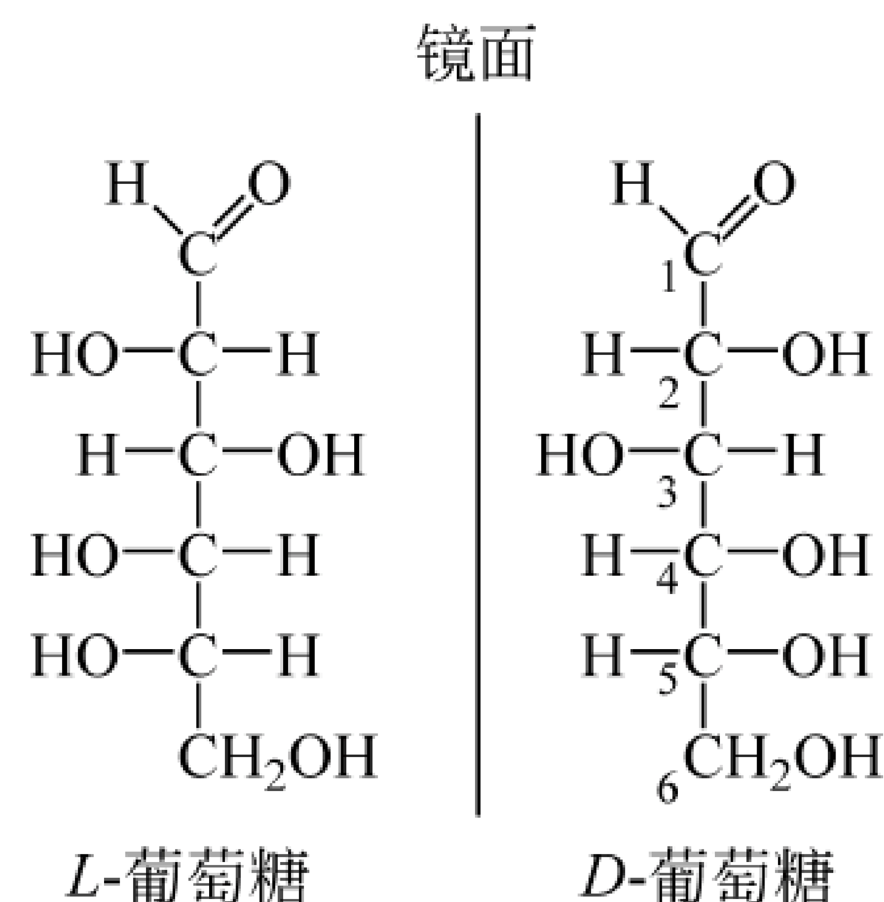


图 6.3 呈镜像关系的 *D*-葡萄糖和 *L*-葡萄糖

如果糖分子之间只是在几个手性碳中一个碳上的构型不同,这样的一对糖分子称为差向异构体(epimers),例如图 6.2 中的 *D*-甘露糖和 *D*-半乳糖就是 *D*-葡萄糖的差向异构体(分别在 C-2 和 C-4 上的构型不同)。

2. 酮糖

图 6.4 给出了在二羟丙酮基础上形成的 *D* 构型的长链酮糖系列,像长链醛糖那样,长链的酮糖也可认为是一个 H—C—OH 或 HO—C—H 插入到羰基和伯醇基之间的延长产物。但酮糖含有的手性碳原子比同一经验公式的醛糖少,例如丁酮糖只有 2 个立体异构体(*D*-赤藓酮糖和 *L*-赤藓酮糖),而丁醛糖则有 4 个立体异构体(*D*-赤藓糖和 *L*-赤藓糖; *D*-苏糖和 *L*-苏糖)。

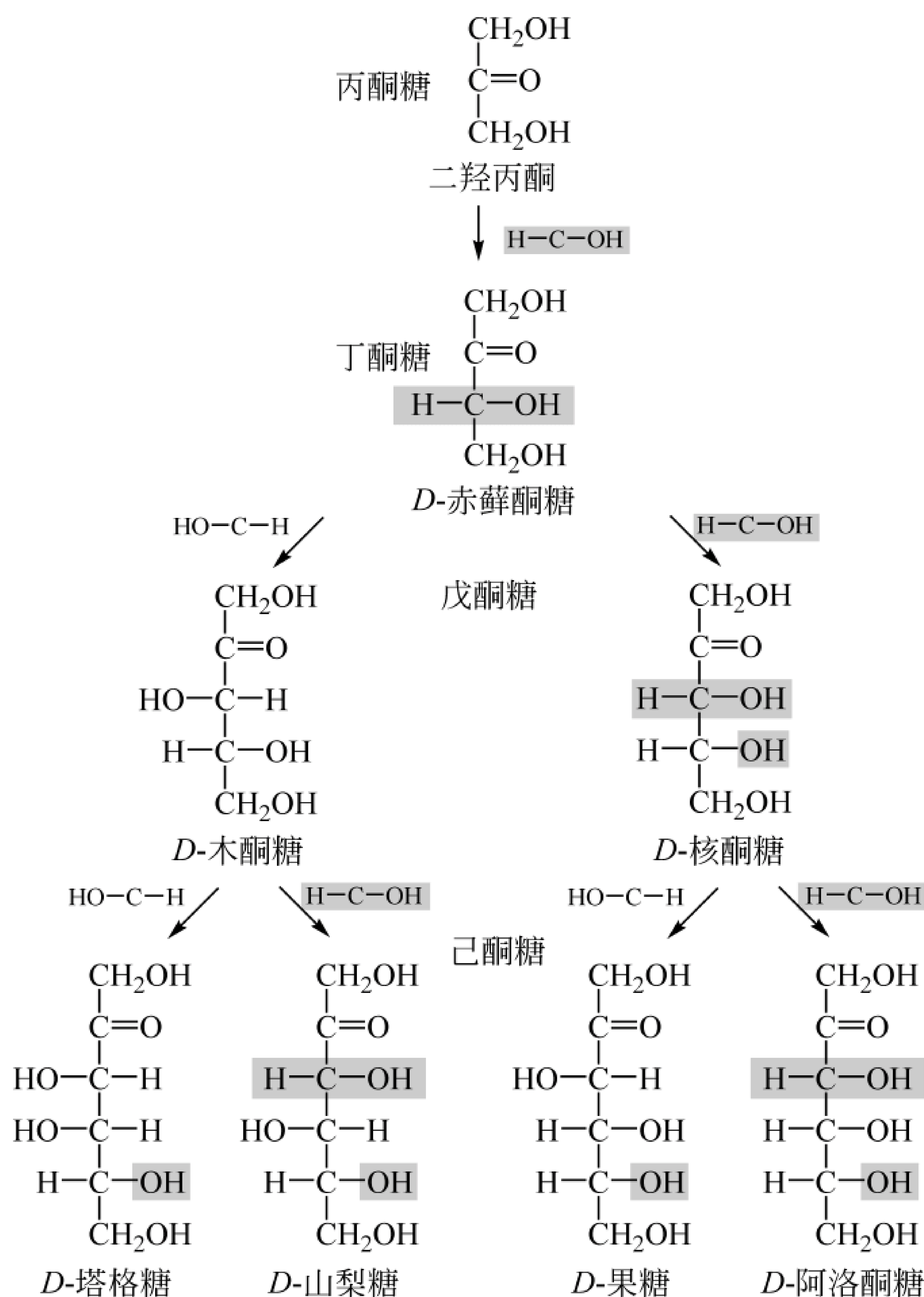


图 6.4 三碳酮糖至六碳酮糖结构

6.1.2 醛糖和酮糖的环化

根据有机化学知识,醛可以与醇形成半缩醛,半缩醛还可以与醇形成缩醛,同样,酮也可以经半缩酮形成缩酮(图6.5)。像葡萄糖那样的醛糖应当可以与醇发生缩醛反应,但实际上只能与一分子醇反应,而像果糖那样的酮糖也是这样只能形成半缩酮。

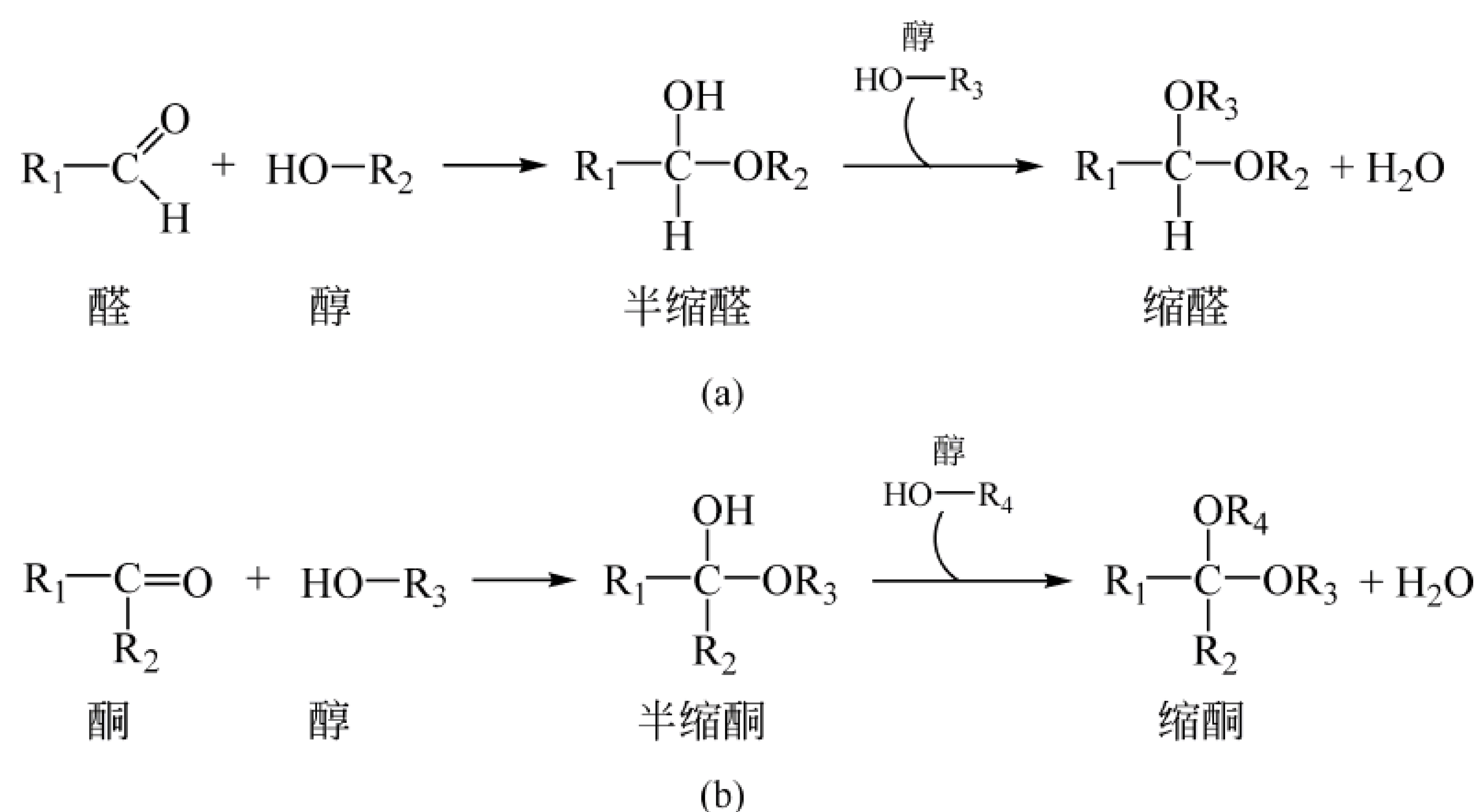


图 6.5 缩醛和缩酮反应

(a) 醛与醇的缩醛反应;(b) 酮与醇的缩酮反应

R_1、R_2、R_3 和 R_4 表示侧链

实验表明醛糖和酮糖之所以只能与一分子醇反应源于它们分子内发生了环化反应。这一环化反应类似于一分子醇与一个醛糖或一个酮糖形成半缩醛或半缩酮的反应。由此,也就不难理解环化的葡萄糖或果糖不能再与2分子醇形成缩醛了。

单糖环化时它们的羰基碳与分子内的一个羟基可形成5元或6元环的一个环式半缩醛或环式半缩酮。参与反应的羟基氧变成了5元或6元杂环结构的一员,杂环结构类似于呋喃(5元杂环)或吡喃(6元杂环),所以相应的糖称为呋喃糖(furanose)或吡喃糖(pyranose)(图6.6)。虽然这样称呼,但糖的杂环不像吡喃和呋喃环那样含有双键。

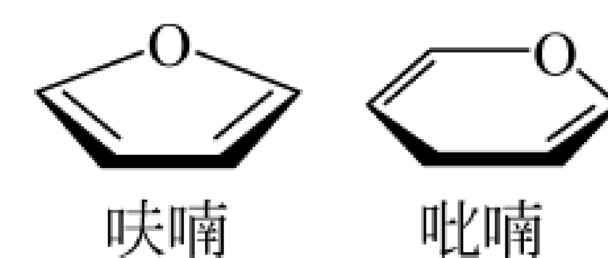


图 6.6 呋喃和吡喃结构

单糖环化后羰基碳成了不对称碳,这个新的手性碳是分子内氧化数最高、惟一一个与两个氧原子结合的碳,称为异头碳(anomeric carbon)。因此,一些单糖的手性碳数目比图6.2或图6.4给出的结构中显示的多一个也就容易理解了。例如,环化后的葡萄糖的手性碳数为5个(而不是4个)。由于异头碳为手性碳,所以环化葡萄糖可呈现α或β两种构型中的任一种(图6.7)。α异构体和β异构体这两个新的立体异构体被称为异构物(anomer)。

在溶液中,有能力形成环结构的醛糖和酮糖,它们的不同环式和开链形式处于平衡中。例如,在31℃下*D*-葡萄糖以近似64%β-*D*-吡喃葡糖和36%α-*D*-吡喃葡糖的平衡混合物存在以及非常少量的开链葡糖或呋喃葡糖(图6.8)。

像葡萄糖在溶液中表现的那样,*D*-核糖也是以近似58.5%β-*D*-吡喃核糖、21.5% α-*D*-

吡喃核糖、13.5%β-*D*-呋喃核糖和6.5% α-*D*-呋喃核糖以及极微量的开链形式核糖的混合物存在的(图6.9)。处于平衡中的单糖的各种不同形式的丰度反映了每种形式的相对稳定性。尽管β-*D*-吡喃核糖是未取代的*D*-核糖的最稳定形式,然而在核苷酸中它的结构是β-*D*-呋喃核糖。

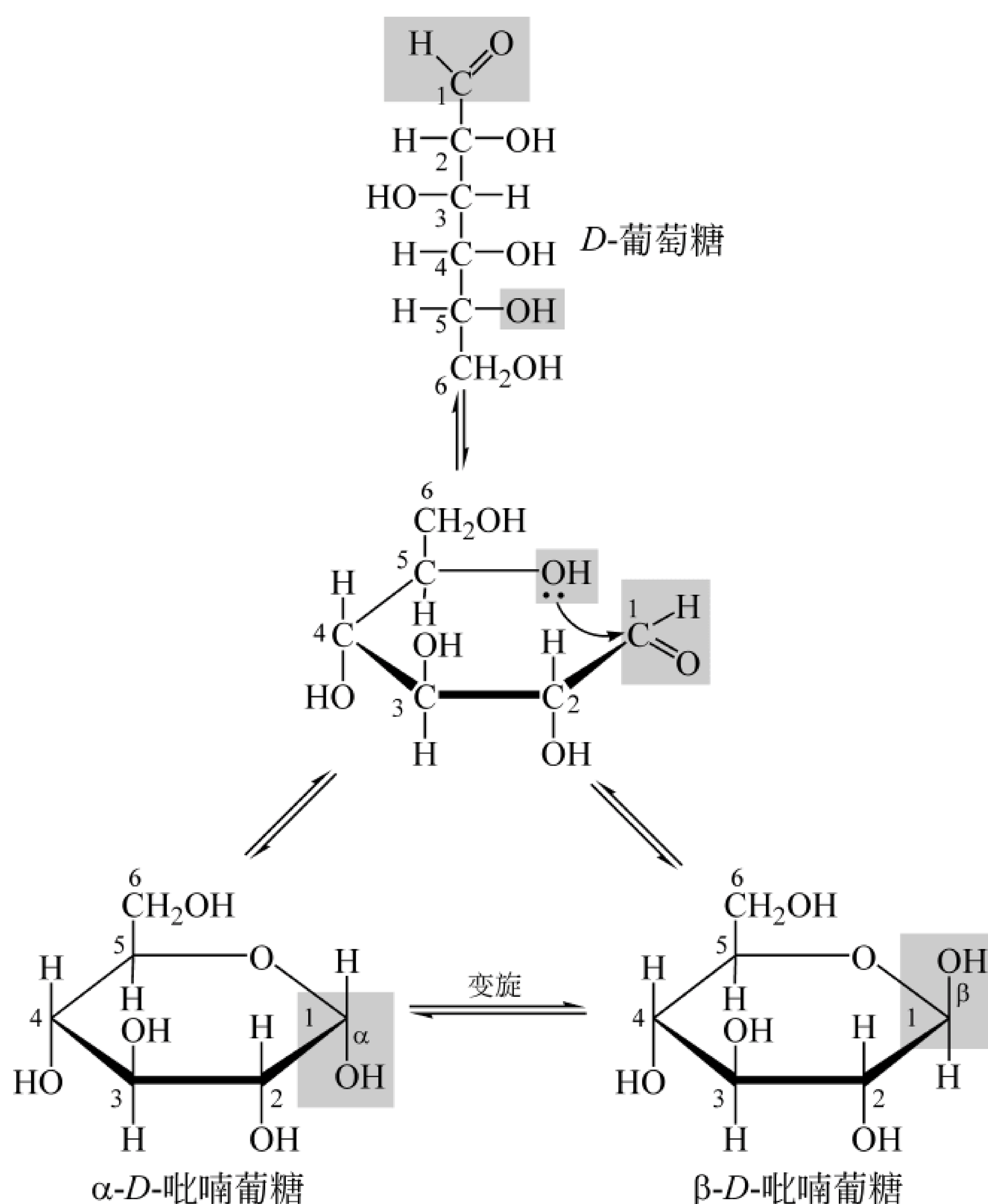


图6.7 *D*-葡萄糖环化形成吡喃葡糖

图中与异头碳C-1连接的OH(阴影)朝下的定义为α-*D*-吡喃葡糖,朝上的定义为β-*D*-吡喃葡糖

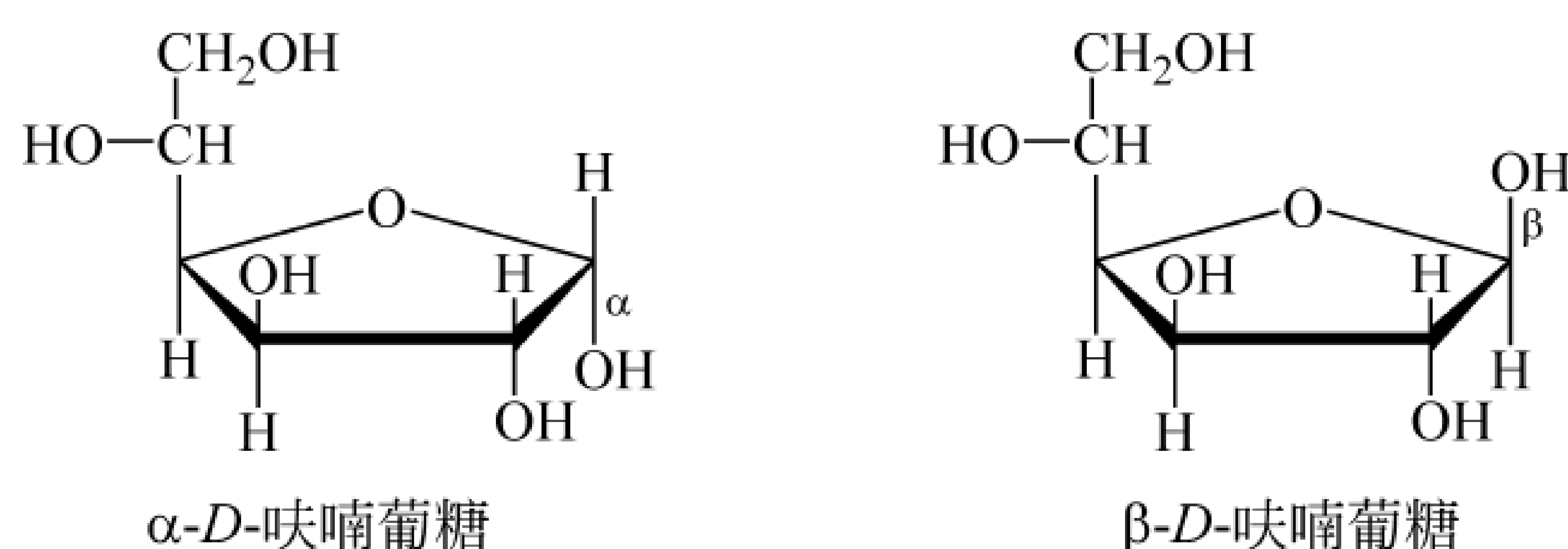


图6.8 呋喃葡糖

图6.7和图6.9中环化后的葡萄糖和核糖都是以Haworth透视式表示的,在Haworth透视式中,环垂直于纸面,靠近读者的边用黑体线表示。环下面—OH为Fisher投影式右边的—OH,而环上面—OH为左边的—OH。之所以称为Haworth透视式是因为Norman Haworth在糖的环化反应中做出了贡献,第一次提出了这些表示方式。由于他在糖结构和维生素C合成方面的卓越工作,获得了1937年的诺贝尔化学奖。

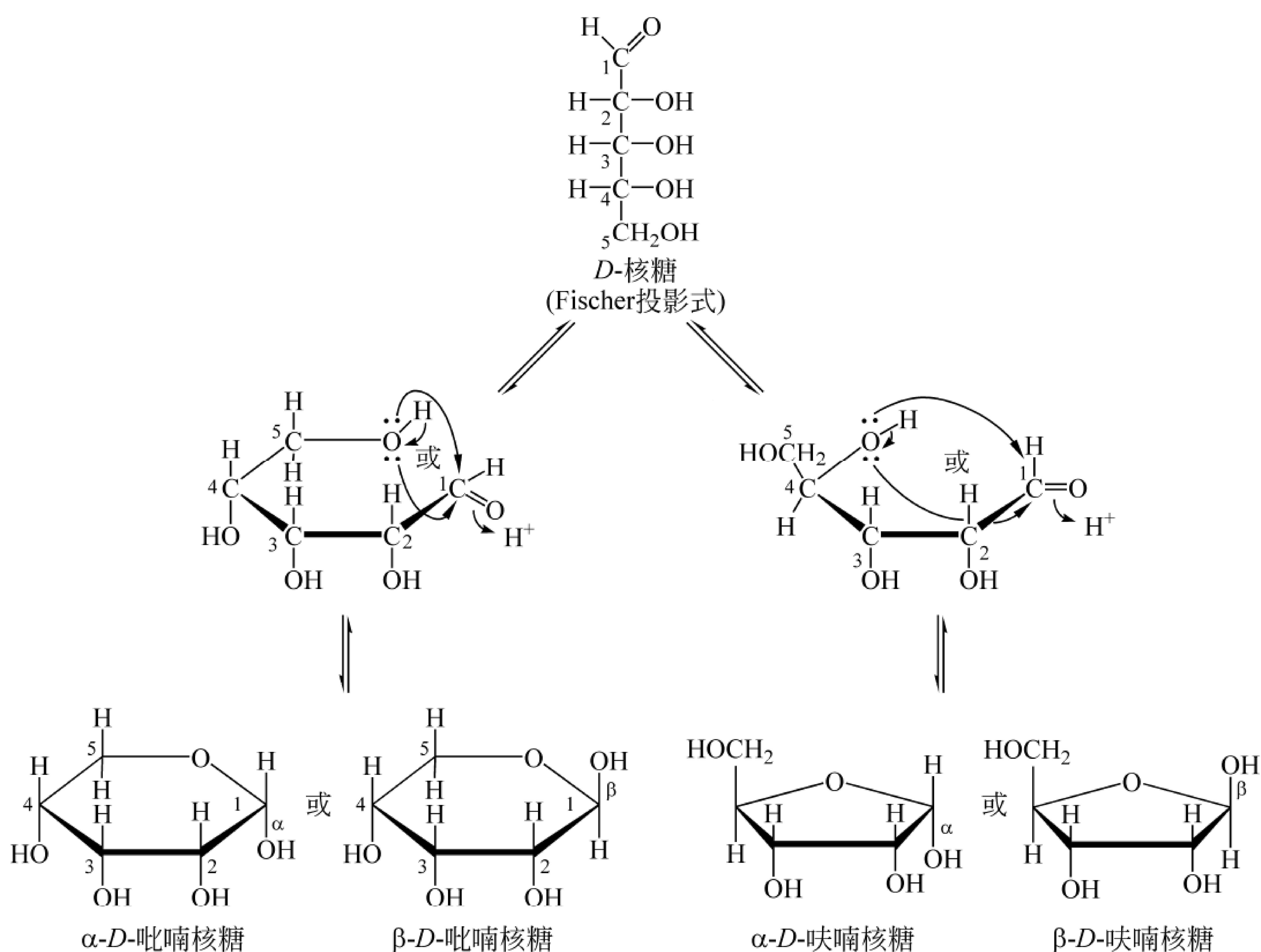


图 6.9 *D*-核糖的环化

D-核糖环化形成 α-*D*-吡喃核糖、β-*D*-吡喃核糖、α-*D*-呋喃核糖和 β-*D*-呋喃核糖

在教材和文献中常将单糖画成 α-*D*-呋喃糖或 β-*D*-呋喃糖,或 α-*D*-吡喃糖或 β-*D*-吡喃糖构型,但要记住五或六碳糖的异头碳构型是处于快速平衡之中。

6.1.3 单糖的构象

由于用 Haworth 透视式能够精确地给出糖骨架的每个碳原子处的原子和基团的构型,所以生物化学中经常使用这种表示方式。然而,一个单糖环的碳原子的几何形状是四面体(键角近似 110°),所以单糖环实际上不是平面。然而环式单糖虽然在三维空间上具有同样的构型,但可以以多种构象存在。

呋喃糖环的构象可以是 5 元环中的一个原子(C-2 或 C-3)突出环外,而其余 4 个原子近似共处一个平面的信封(型)构象。呋喃糖也可以形成扭型构象,每种构象的相对稳定性都取决于羟基之间立体干扰的程度。实际上未取代单糖的不同构象相互之间可以快速地转换(图 6.10)。

吡喃糖环倾向于采用椅式构象(chair conformation)或船式构象(boat conformation)(图 6.11)。实际上对于每个吡喃糖都存在着 2 种不同的椅式构象和 6 种不同的船式构象。由于在椅式构象中可以使环取代基的立体排斥降至最小,所以椅式构象比船式更稳定。

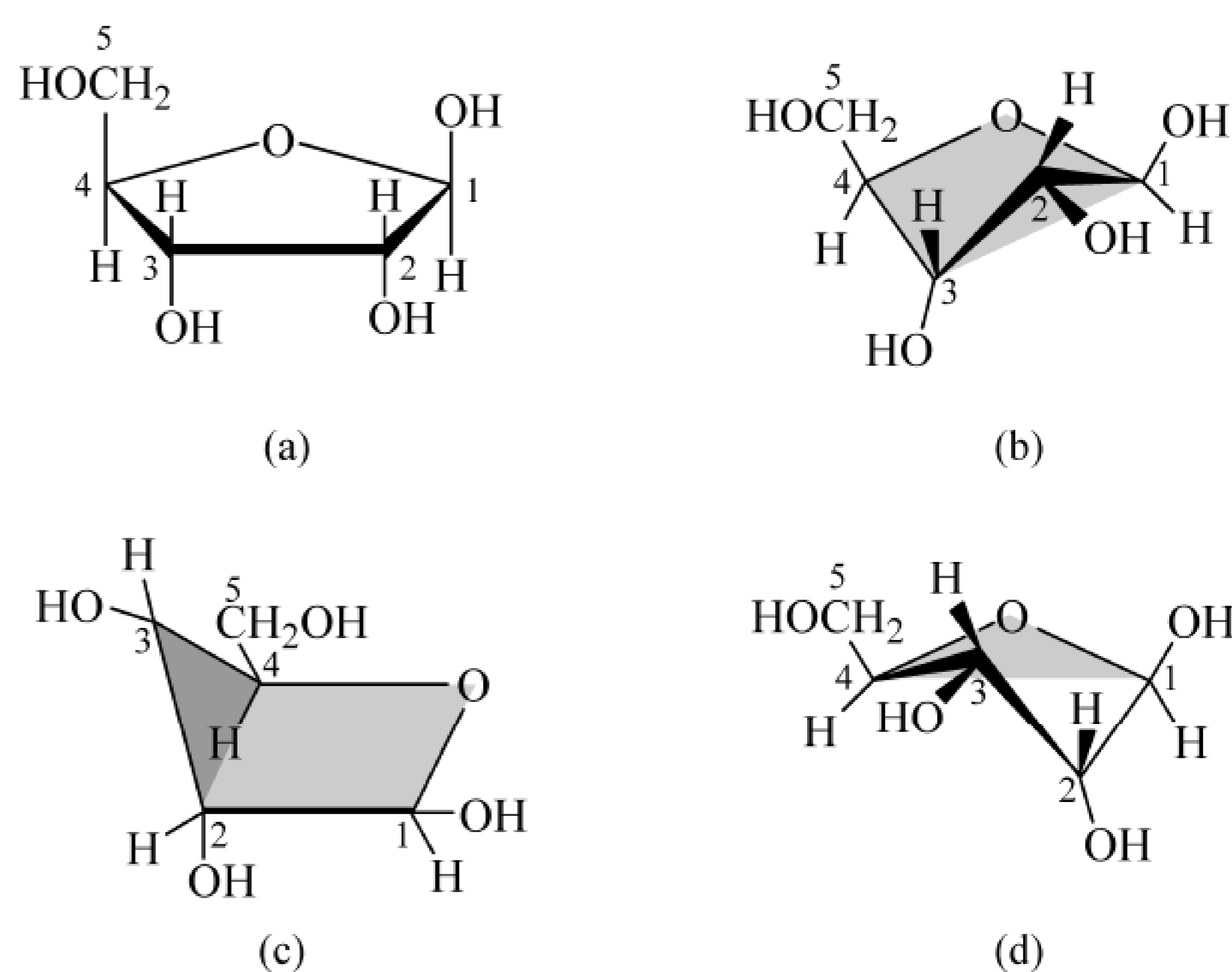


图 6.10 β-*D*-呋喃核糖的构象

(a) Haworth 透视式；(b) C_2-内信封(型)构象；(c) C_3-内信封(型)构象；(d) 扭型构象

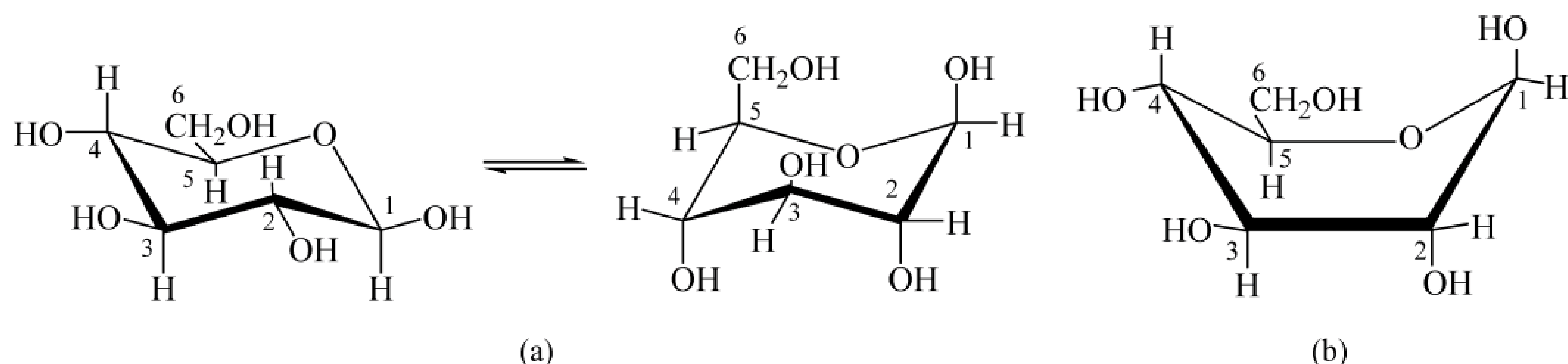


图 6.11 β-*D*-吡喃葡糖的构象

(a) 左边的椅式构象是主要的构象，最大取代物 CH_2OH 与 OH 都处于平伏(赤道)位置，相互干扰小，更稳定，而右边的椅式构象中 CH_2OH 与 OH 都处于垂直(轴向)位置，相互干扰大；(b) 船式构象

6.1.4 单糖的衍生物

单糖是多羟基的醛或酮，羟基可以参与酯化反应形成酯，醛基或伯醇基可被氧化成羧基，形成糖酸，与醇反应形成糖苷等。

1. 糖磷酸酯

在后面糖代谢中会看到，在生物体内单糖在酶催化下可生成各种磷酸酯(图 6.12)。由于糖含有多个羟基，与磷酸反应可以生成不同位置的糖磷酸酯，例如在葡萄糖异头碳 C_1 可形成葡糖-1-磷酸，在 C_6 位可形成葡糖-6-磷酸。

2. 脱氧糖

单糖中的一个或多个羟基被氢原子取代后的产物称为脱氧糖(deoxy sugar)(图 6.13)。2-脱氧-*D*-核糖是生物学上最重要的脱氧糖，用于 DNA 的合成。α-*L*-岩藻糖(6-脱氧-*L*-半乳糖)广泛存在于植物、动物和微生物。

3. 氨基糖

氨基糖(amino sugar)指的是单糖上的羟基被氨基取代后形成的衍生糖。如葡萄糖 2 位羟基被氨基取代后可形成 α-*D*-葡糖胺。有时氨基被乙酰化，如半乳糖乙酰化形成 *N*-乙酰

半乳糖胺(*N*-acetylgalactosamine, GalNAc)(图 6.14)。葡糖胺的氨基乙酰化也可形成 *N*-乙酰-*D*-葡糖胺(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)。

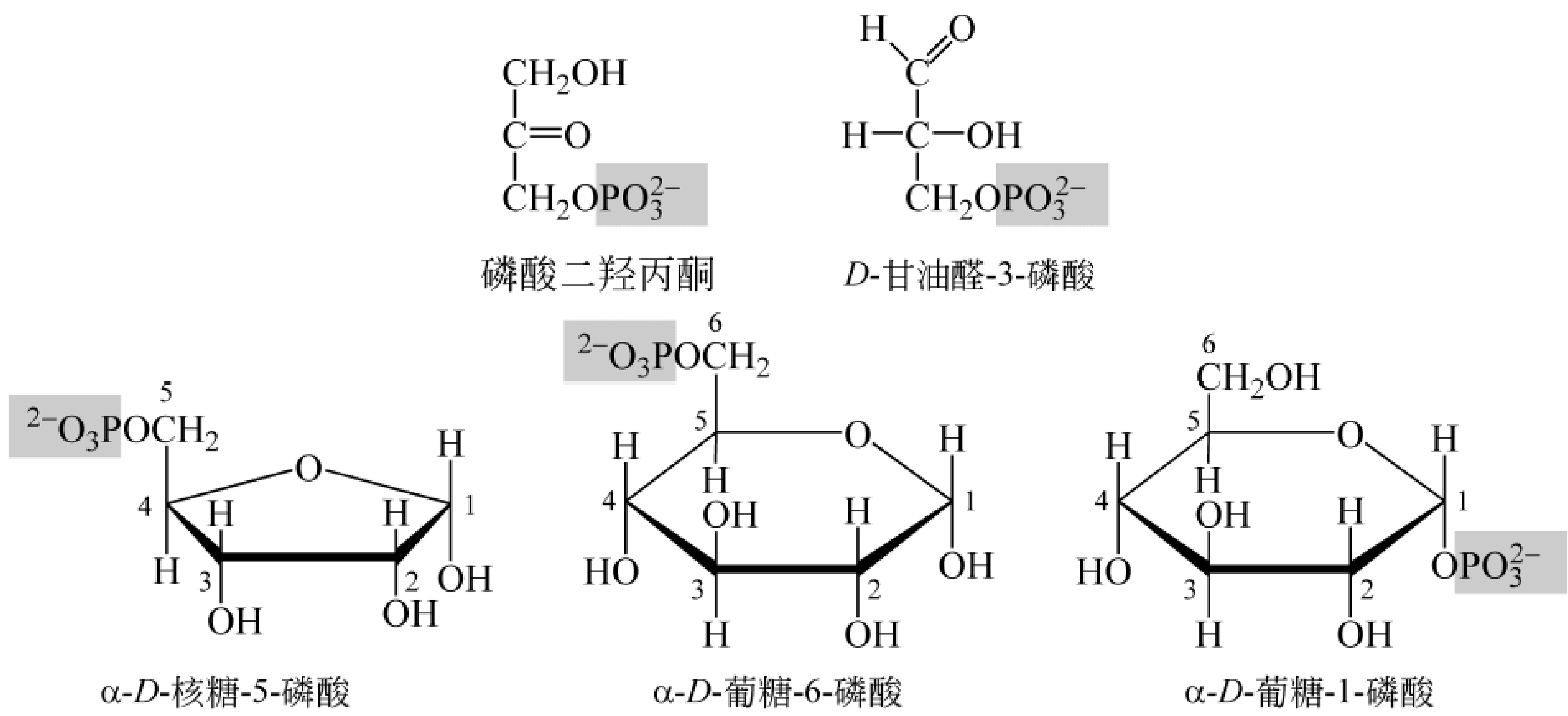


图 6.12　几种糖磷酸酯结构

磷酸部分在生理 pH 下呈解离状态,常写作为 PO_3^{2-}

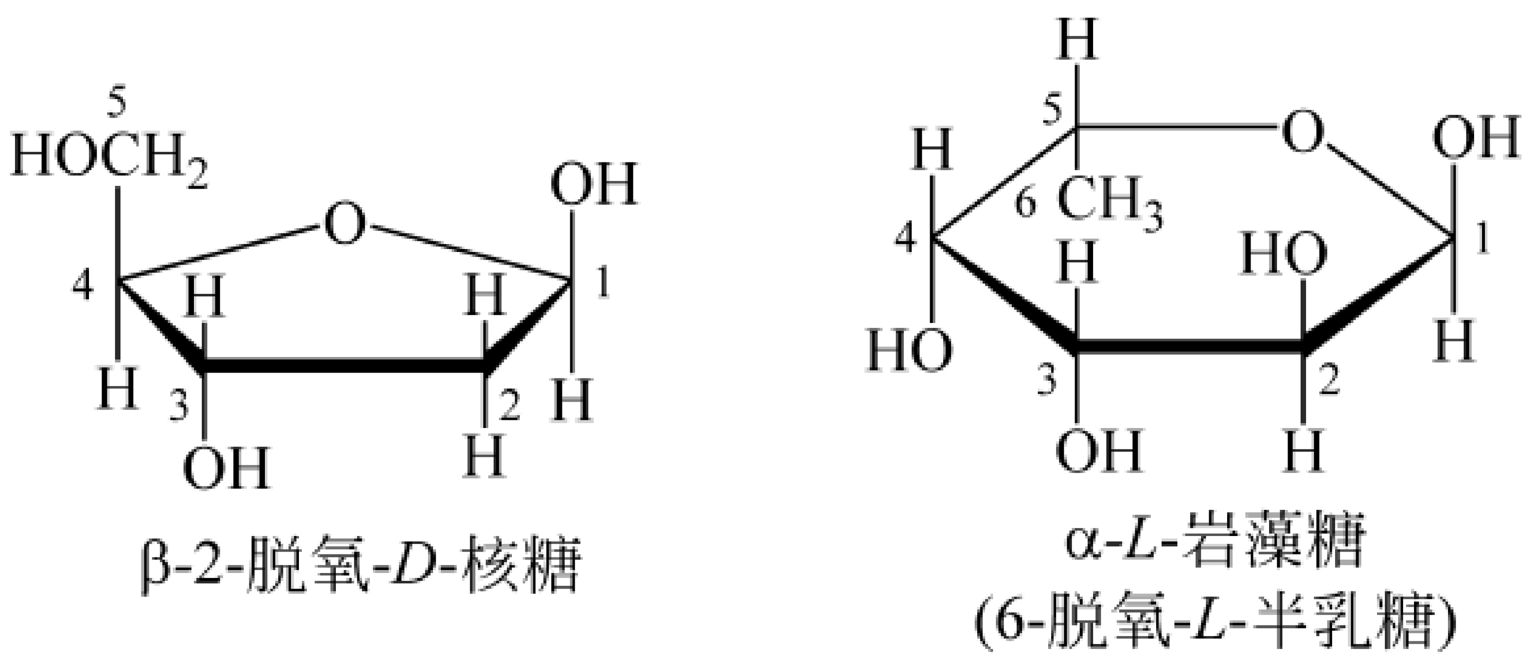


图 6.13　2 种脱氧糖

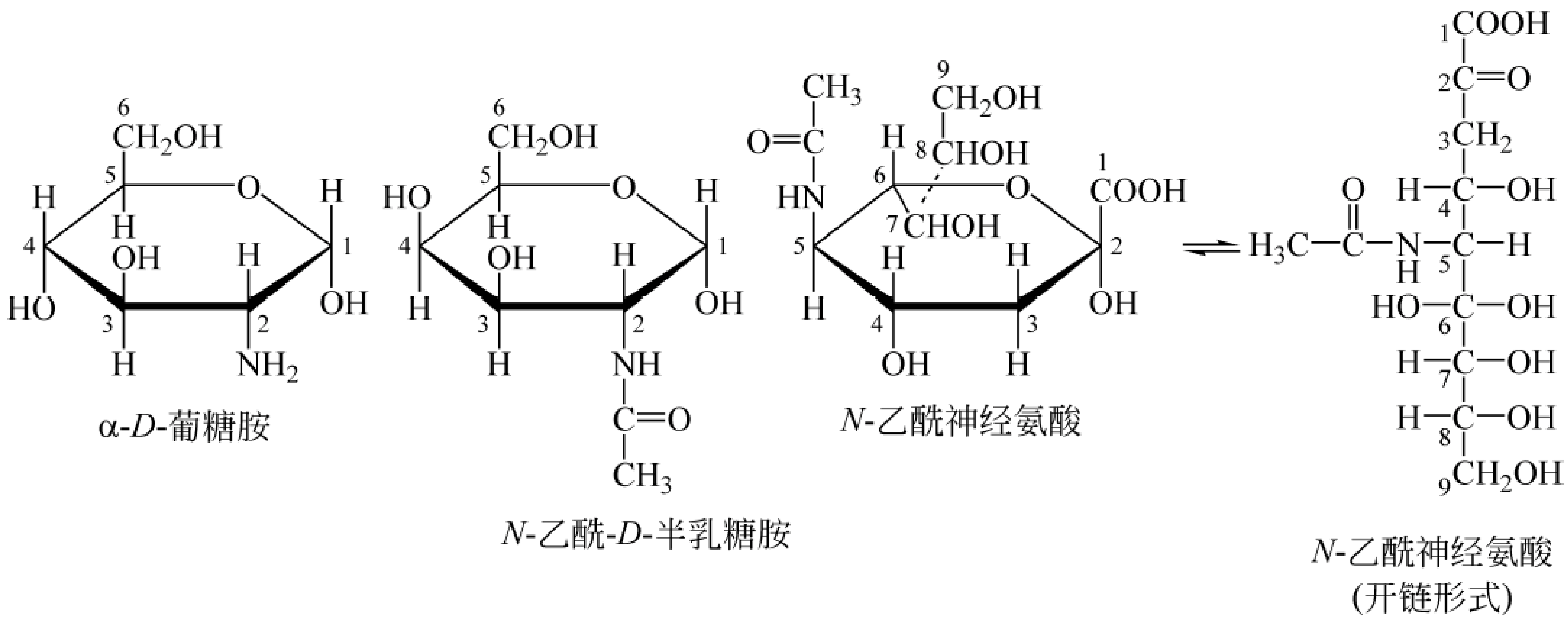


图 6.14　3 种氨基糖结构

氨基糖常出现在结合多糖中,*N*-乙酰葡糖胺是几丁质的构件分子,*N*-乙酰神经氨酸(*N*-acetylneuraminic acid,NeuNAc)是许多糖蛋白和神经节苷脂(ganglioside)的重要组成成分。神经氨酸(neuraminicacid)和它的衍生物,包括 NeuNAc 统称为唾液酸(sialicacid,Sia)。

4. 糖醇

糖醇(sugar alcohol)是原来单糖的羰基氧被还原生成的多羟基醇(图 6.15)。甘油和环状多羟基肌醇都是脂类的重要成分,核糖醇是黄素辅基的组成成分,也是磷壁酸(teichoic acid)的成分,磷壁酸常出现在某些革兰阳性细菌的细胞壁中。木糖醇(xylitol)是一种增甜剂,其甜度类似于蔗糖,常用于制备无糖口香糖和糖果。*D*-山梨醇(*D*-sorbitol)是植物中普遍存在的一种糖醇,常用作口香糖和点心的增甜剂,其甜度不及木糖醇。

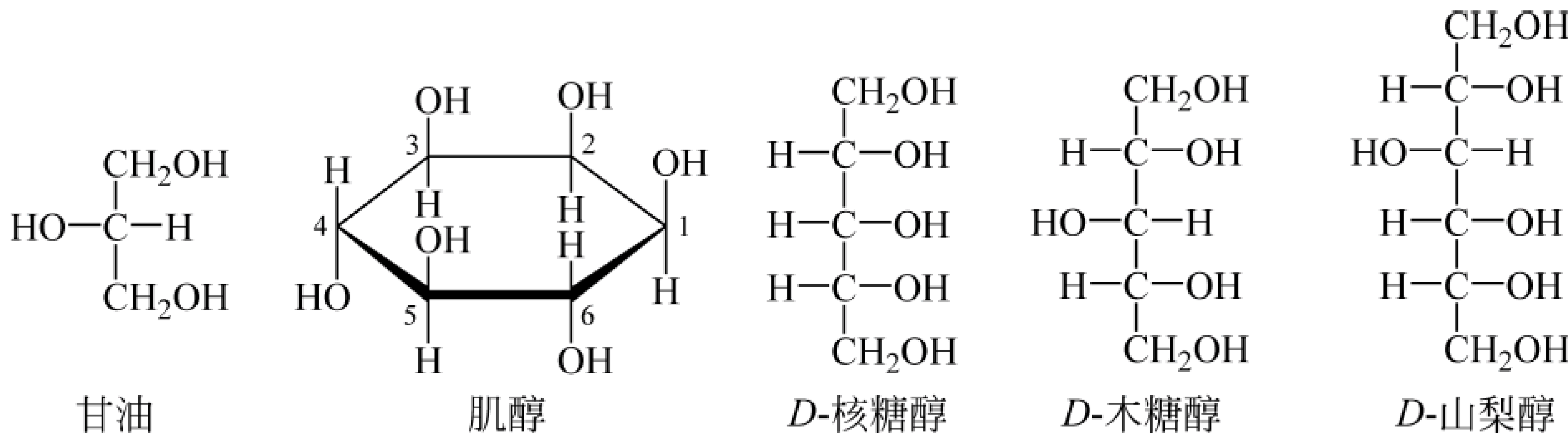


图 6.15 5 种糖醇结构

5. 糖酸

糖酸(sugar acid)是醛糖被氧化生成的羧酸,单糖的羰基或羟基都可被氧化为羧基,生成不同的糖酸。例如葡萄糖的末端醛基被氧化可生成葡糖酸,末端—CH_2OH 被氧化可生成葡糖醛酸,葡糖醛酸可以以吡喃糖形式存在(图 6.16)。

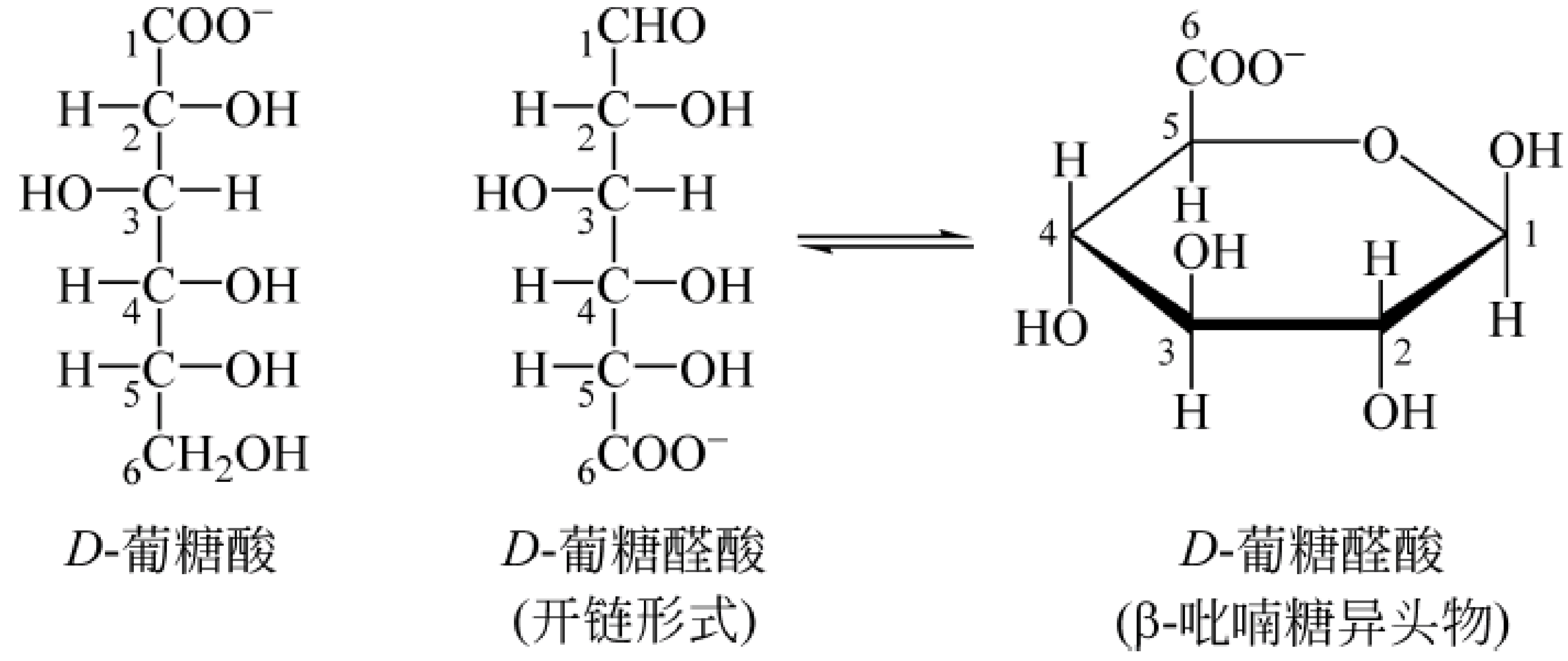


图 6.16 由 *D*-葡萄糖衍生的糖酸结构

6.2 二糖和其他糖苷

单糖的半缩醛(或半缩酮)羟基可以与一个醇、一个胺、另外一个糖或一个碱基(嘌呤或嘧啶)等形成缩醛(或缩酮),也称为糖苷(glycoside),两者之间形成的化学键称为糖苷键(glycosidic bond)。举一个最简单的例子,在酸性溶液中吡喃葡糖与甲醇反应可形成缩醛甲基葡糖苷。由于葡萄糖存在异头碳,产物为 α-甲基-*D*-葡糖苷和 β-甲基-*D*-葡糖苷两种异构体(图 6.17)。

6.2.1 几种二糖

一个单糖的半缩醛羟基与其他单糖中的任一个羟基反应可形成二糖。图 6.18 给出了

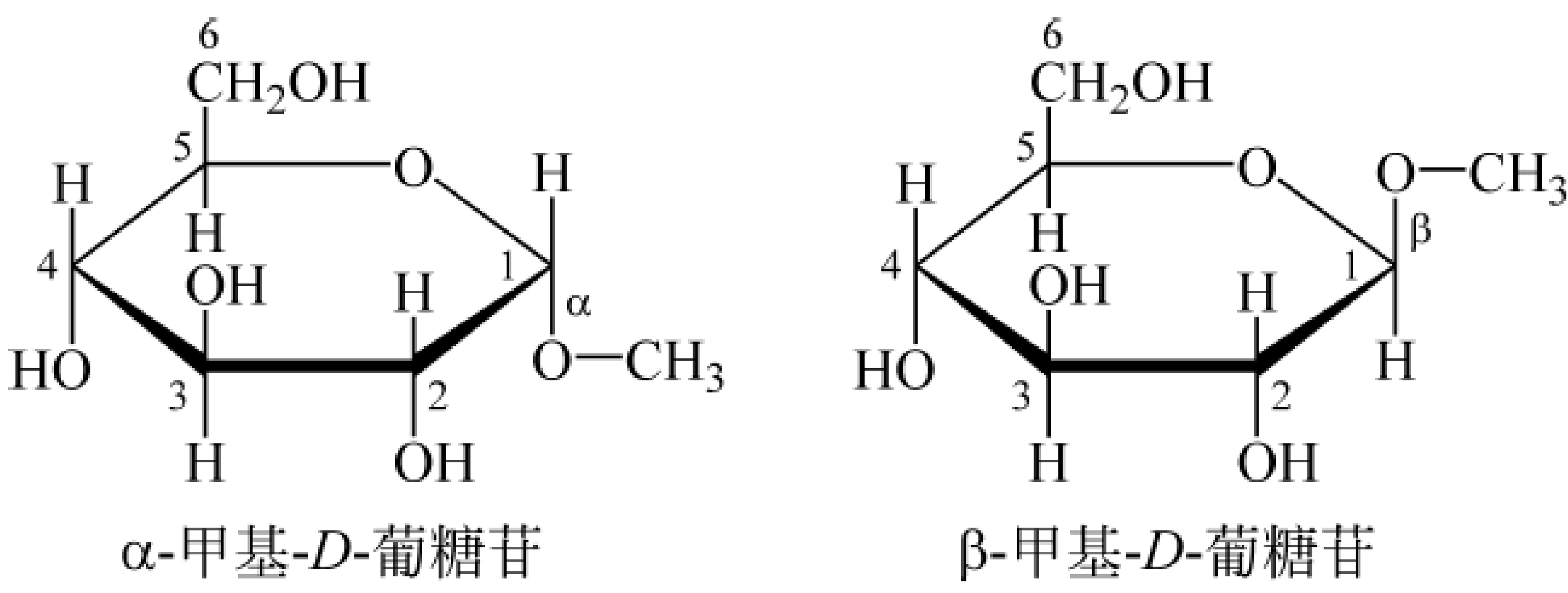


图 6.17　甲基葡糖苷

常见的二糖麦芽糖、异麦芽糖、纤维二糖、乳糖和蔗糖的结构。在描述一个二糖时,连接的原子、糖苷键的构型和每个单糖残基的名称都应当予以说明。

(a)　(b)

(c)　(d)

(e)

图 6.18　几种二糖结构

(a) 麦芽糖;(b) 异麦芽糖;(c) 纤维二糖;(d) 乳糖;(e) 蔗糖

1. 麦芽糖

麦芽糖(maltose)是由一个α-*D*-吡喃葡糖的半缩醛羟基与第二个葡萄糖的C-4上的羟基反应形成的二糖。要注意,第一个葡萄糖必须是α-吡喃形式,而第二个葡萄糖残基可以处于α吡喃或β吡喃形式,所以有时也将麦芽糖中的糖苷键称为α(1→4)糖苷键。

图6.18(a)只给出了麦芽糖的β吡喃形式,被命名为α-*D*-吡喃葡糖基-(1→4)-β-*D*-吡喃葡糖,也存在α-*D*-吡喃葡糖基-(1→4)-α-*D*-吡喃葡糖。淀粉(葡萄糖聚合物)经淀粉酶水解可以释放出麦芽糖。

2. 异麦芽糖

异麦芽糖(isomaltose)是一个α-*D*-吡喃葡糖的半缩醛羟基与第二个葡萄糖的C-6上的羟基反应形成的二糖,图6.18(b)的异麦芽糖命名为α-*D*-吡喃葡糖基-(1→6)-β-*D*-吡喃葡糖。

3. 纤维二糖

纤维二糖(cellobiose)是葡萄糖的另一个二聚体,纤维二糖与麦芽糖的区别在于糖苷键,纤维二糖中是β(1→4)糖苷键,而麦芽糖中是α(1→4)糖苷键。纤维二糖的第一个葡萄糖必须是β-吡喃形式,而第二个葡萄糖残基可以处于α吡喃或β吡喃形式,图6.18(c)是纤维二糖的β-吡喃形式,命名β-*D*-吡喃葡糖基-(1→4)-β-*D*-吡喃葡糖。

纤维二糖是纤维素中重复的二糖单位,纤维素经纤维素酶降解可以释放出纤维二糖。

4. 乳糖

乳糖(lactose)是β-吡喃半乳糖与葡萄糖形成的二糖,葡萄糖残基可以处于α吡喃或β吡喃形式。图6.18(d)中的乳糖是β-吡喃形式,被命名为β-*D*-吡喃半乳糖基-(1→4)-α-*D*-吡喃葡糖。乳糖在体内小肠中经乳糖酶(或β-*D*-半乳糖酶)水解为葡萄糖和半乳糖进入血液。半乳糖经酶催化可以转换为葡萄糖。

乳糖是奶中主要的糖,乳糖只在泌乳的乳腺中合成。α-吡喃乳糖要比β-吡喃乳糖更甜,溶解度更好。冰淇淋中存在着β-吡喃乳糖,在储存时结晶使得冰淇淋吃起来有粗砂糖的感觉。

有些人乳糖酶水平低,当他们喝牛奶或食用含乳糖的食物后会有恶心、腹痛、腹胀、腹泻和产气增多等不良反应,主要原因是牛奶中没有被完全消化或完全没有被消化的乳糖经由消化道到达结肠,结肠中细菌使乳糖发酵产生大量的CO_2、H_2和刺激性有机酸引起疼痛性消化不适,这种现象称为乳糖不耐受性。

不能喝牛奶的人可选择喝酸奶,酸奶是牛奶经乳酸菌发酵制成的,牛奶中的乳糖经发酵已被乳酸菌用作“燃料”了。

5. 蔗糖

蔗糖(sucrose)是一分子α-*D*-吡喃葡糖的半缩醛羟基与一分子β-*D*-呋喃果糖的半缩酮羟基反应形成的二糖,被命名为α-*D*-吡喃葡糖基-(1→2)-β-*D*-呋喃果糖[图6.18(e)]。

6.2.2 还原糖和非还原糖

糖的氧化还原反应在生物化学中起着重要的作用,在有氧条件下糖完全氧化为CO_2和H_2O,可为生物体的生存提供大量能量,这部分内容将在下面糖代谢中详细描述。

在实验室中糖的几个氧化反应也很重要,醛基可以被氧化为羧基(酸的特征基团),所以该反应是鉴定醛糖存在的基础实验。由于醛糖氧化的同时可以使一些氧化剂还原,所以醛糖通常称为还原糖(reducing sugars),例如像葡萄糖那样的单糖,以及一些具有游离异头碳

的糖都具有还原性,如麦芽糖和乳糖的二糖都属于还原糖。但像蔗糖那样两个异头碳都被固定在糖苷键中,不存在游离异头碳,很难被氧化,所以这样的糖称为非还原糖。酮糖也是还原糖,因为它可以异构化为醛糖。

以往实验室常用 Tollens 试剂,即银氨试剂[$Ag(NH_3)_2^+$]检测还原糖。当将 Tollens 试剂加入待检测试管中,如有还原糖,Ag^+ 被还原为金属 Ag,并沉积在试管壁上,形成银镜,所以该反应又称为银镜反应(图 6.19)。

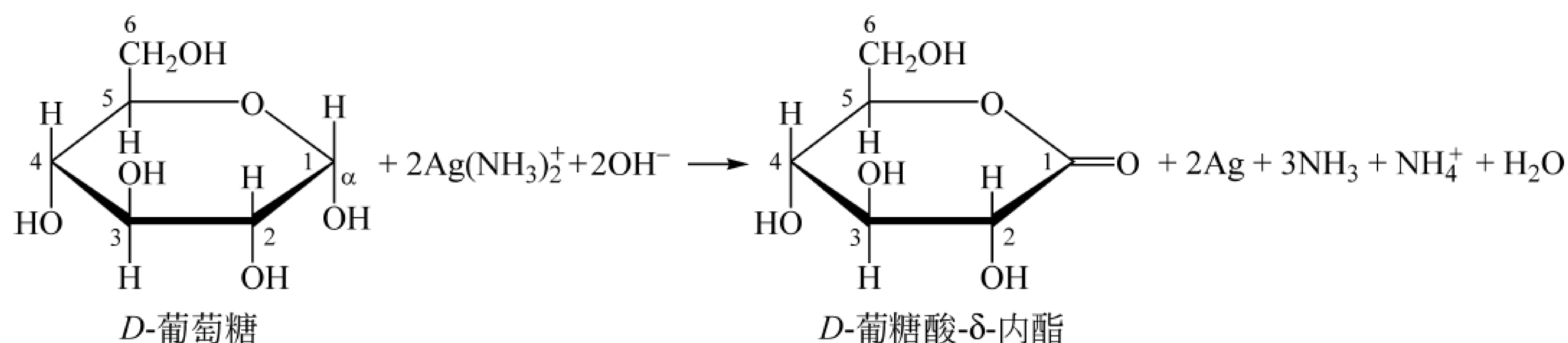


图 6.19 银镜反应

Ag^+ 被还原为金属 Ag,同时 α-*D*-葡萄糖的半缩醛被氧化为 *D*-葡糖酸-δ-内酯

6.2.3 核苷和其他糖苷

糖的异头碳不仅能与其他糖,而且也可以与各种醇、胺和硫醇形成糖苷键。除了本章描述的寡糖和多糖外,就是经常遇到的核苷了。核苷是嘌呤或嘧啶通过仲胺基与 β-*D*-呋喃核糖或 β-*D*-呋喃脱氧核糖形成的糖苷。核苷也称为 *N*-(糖)苷,因为氮原子参与糖苷键的形成。例如腺苷就是一个典型的核苷(图 6.20),此外,已描述过的辅酶 NAD^+ 和 FAD 也都是核苷。另外,图 6.20 还给出了存在于自然界中的另外两种糖苷-香草醛糖苷和 β-*D*-半乳糖基-1-甘油酯。

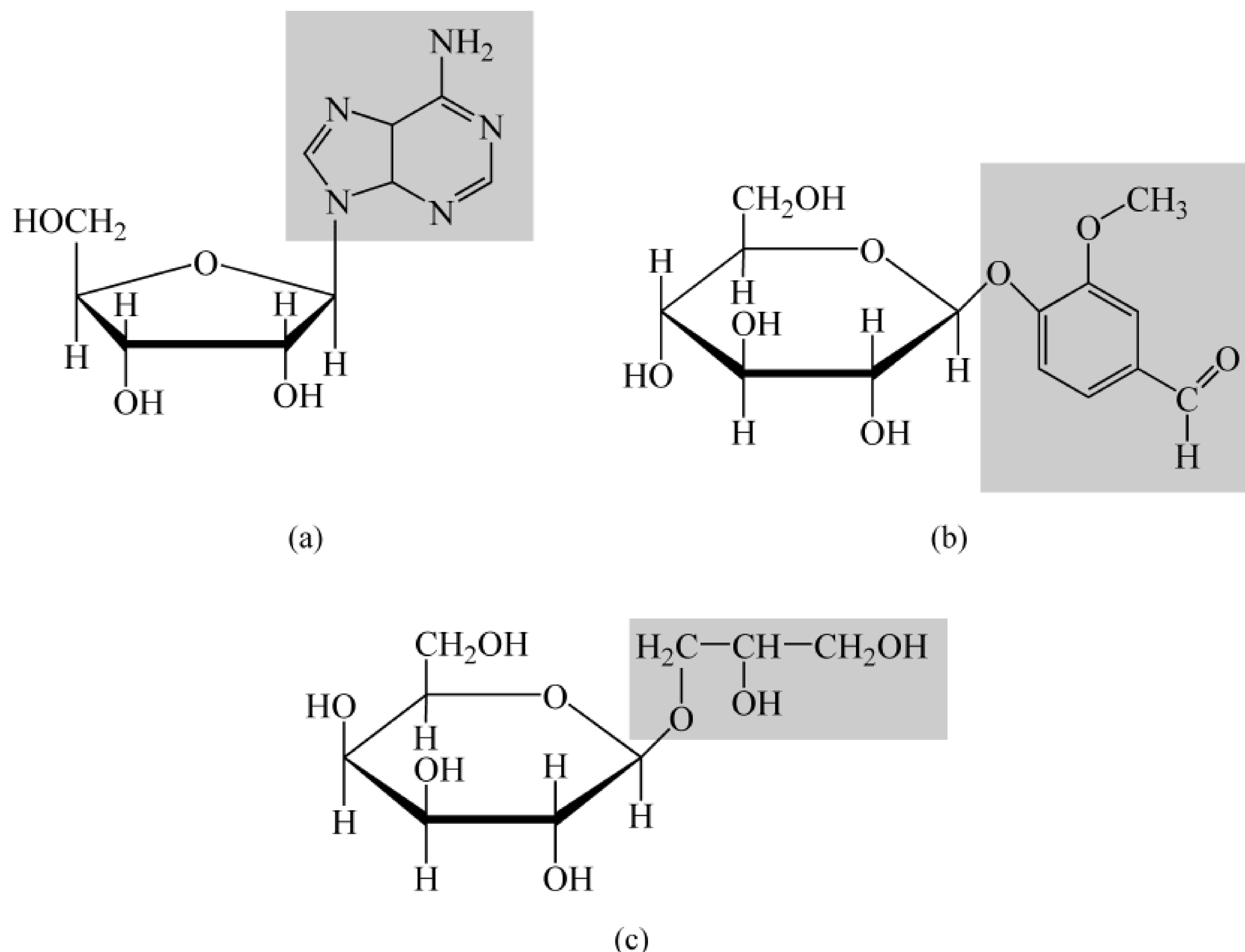


图 6.20 3 种糖苷结构

阴影为非糖部分。(a) 腺苷;(b) 香草醛(香草提取物)糖苷;(c) β-*D*-半乳糖基-1-甘油酯

6.3 多糖

多糖也称为聚糖，是由单糖单位聚合形成的，按照单糖单位组成不同又可将多糖分为由单一一种单糖缩合形成的同多糖(homopolysaccharides)和由两种类型以上单糖组成的杂多糖(heteropolysaccharides)。多糖不像蛋白质是由基因编码的，多糖的生成没有模板，而是由特定的单糖和寡糖残基聚合形成的。按照用途，多糖又可分为储存多糖和结构多糖。

6.3.1 储存多糖：淀粉和糖原

对许多生物来说，D-葡萄糖是它们的代谢能源，而葡萄糖大多是以聚合物的形式储存在细胞内的。植物和真菌中储存最多的同多糖称为淀粉，而在动物中称为糖原，这两种类型的同多糖也都存在于细菌中(图 6.21)。

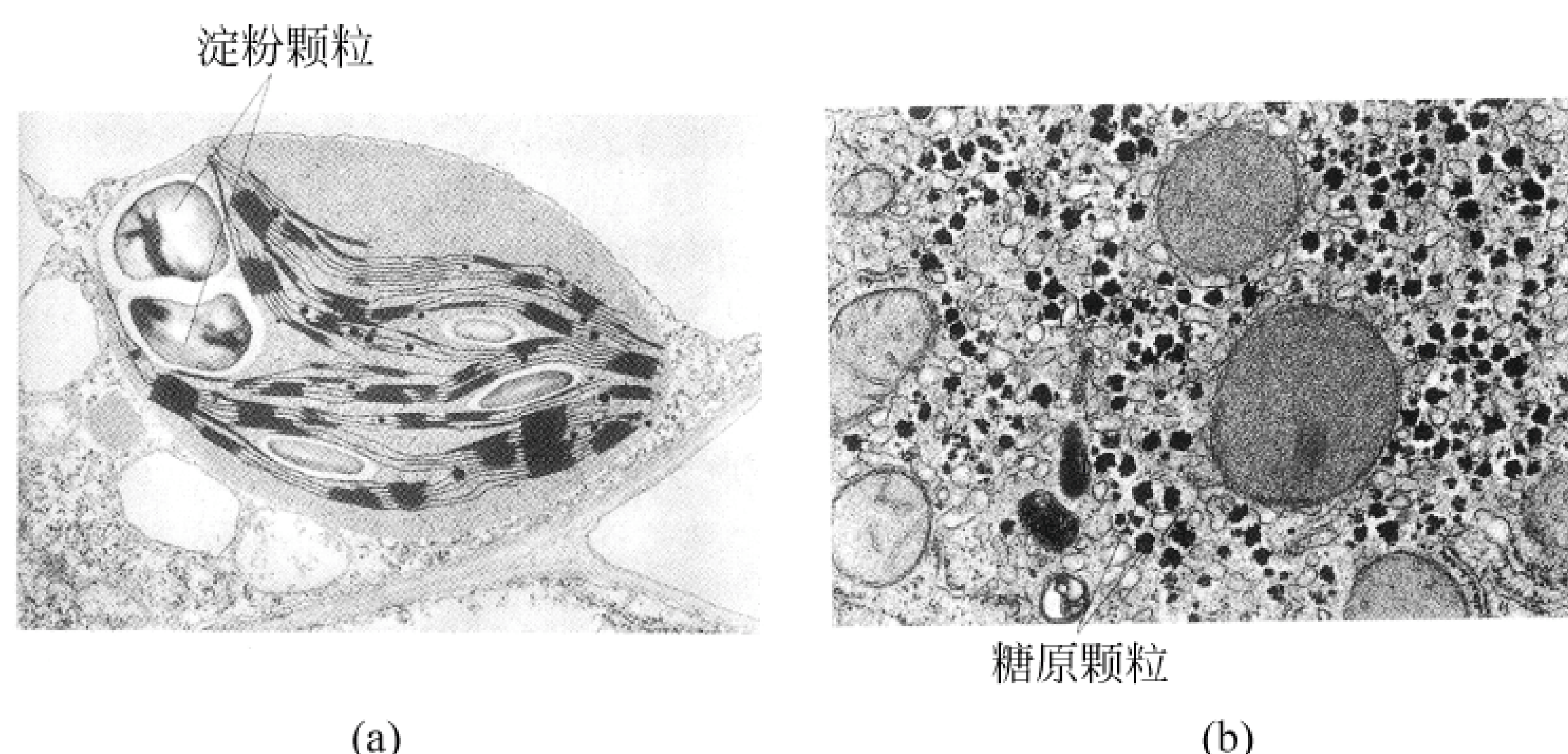


图 6.21 淀粉和糖原颗粒(电镜照片)

(a) 叶绿体中的淀粉颗粒(约 1.0μm)；(b) 胞质溶胶中的糖原颗粒(约 0.1μm)

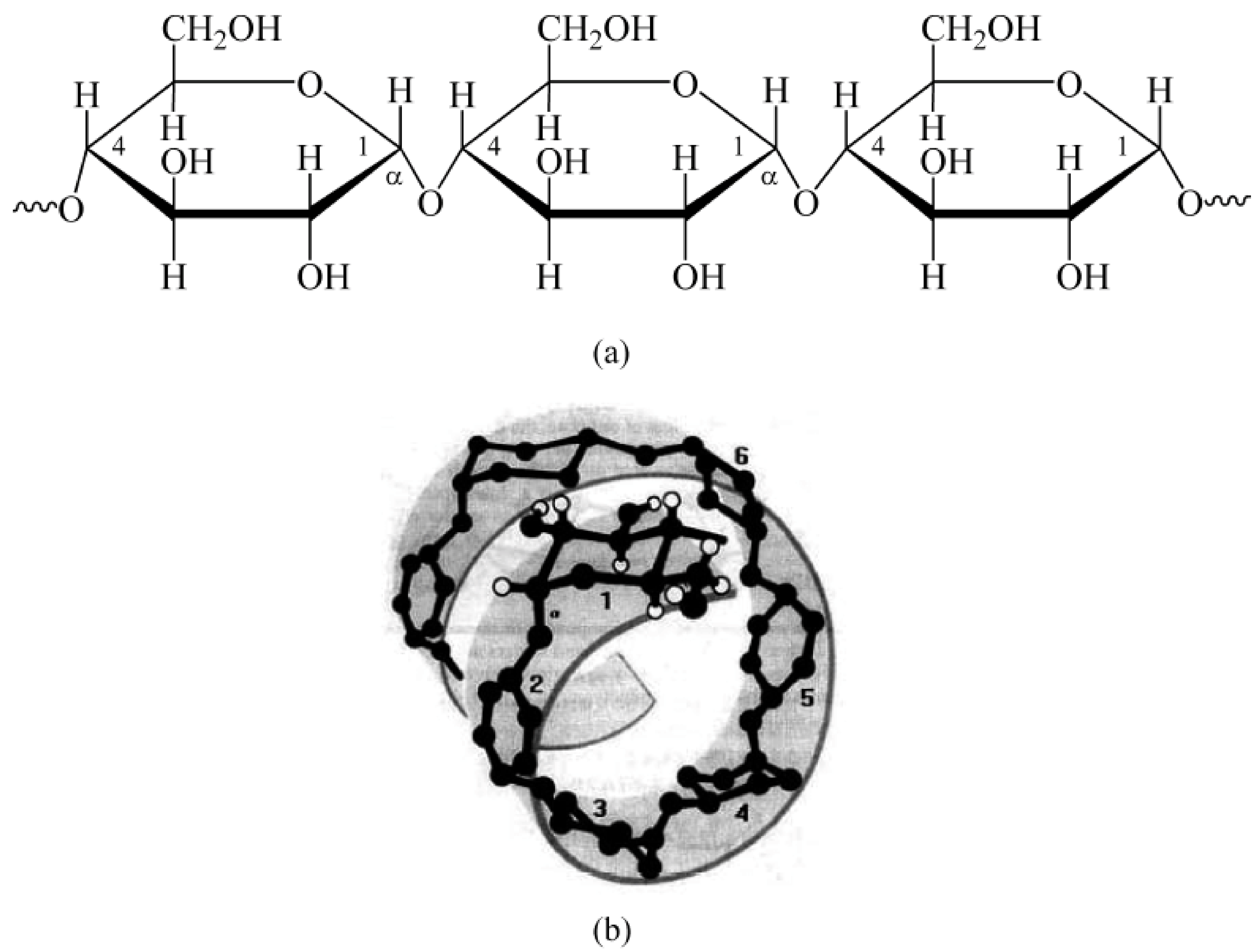
1. 淀粉

植物细胞中的淀粉是以直链淀粉(amylose)和支链淀粉(amylopectin)混合物形式储存在直径 3～100μm 的颗粒中。直链是由 100～1000 个 *D*-葡萄糖通过 α(1→4)糖苷键连接形成的无分支聚合物。由于通过 α(1→4)糖苷键连接，所以直链淀粉中一个葡萄糖残基相对下一个葡萄糖残基都呈一定的角度，结果形成像左手螺旋那样的螺旋结构，每圈螺旋含有 6 个葡萄糖残基(图 6.22)。螺旋内能容纳碘原子，形成淀粉和碘的复合物，呈现出蓝色，该现象常用于淀粉的定性检测。

支链淀粉是带有分支的淀粉(图 6.23)。在支链淀粉中除了由 α(1→4)糖苷键连接的葡萄糖链以外，还含有在分支点处由 α(1→6)糖苷键连接的分支，平均每 25 残基就会出现一个分支，一个支链含有 15～25 个葡萄糖残基，一些侧支本身还会再分支。从活细胞中分离出的支链淀粉含有 300～6000 个葡萄糖残基。

一个成人每天约消耗 300g 糖，主要是主食中的淀粉。生淀粉颗粒耐受酶水解，但蒸煮可使它吸收水和膨胀，膨胀后的淀粉就成了两种糖苷酶的底物。饮食中淀粉在胃肠道被 α-淀粉酶(α-amylase)和去分支酶(debranching enzyme)降解。动物和植物都含有 α-淀粉酶，该酶是一种内切糖苷酶(endoglycosidase)。另外，还有一种存在于某些植物的种子和块茎

中的 β-淀粉酶(β-amylase),它是一种外切糖苷酶(exoglycosidase)。α-淀粉酶和 β-淀粉酶中的 α 和 β 指的是淀粉酶的类型,而不是底物糖苷键的构型。两种类型的淀粉酶都只作用于淀粉 α(1→4)糖苷键,水解释放出麦芽糖。



(a)

(b)

图 6.22　直链淀粉

(a) 直链淀粉结构;(b) 直链淀粉的卷曲螺旋构象,碘原子可进入螺旋内

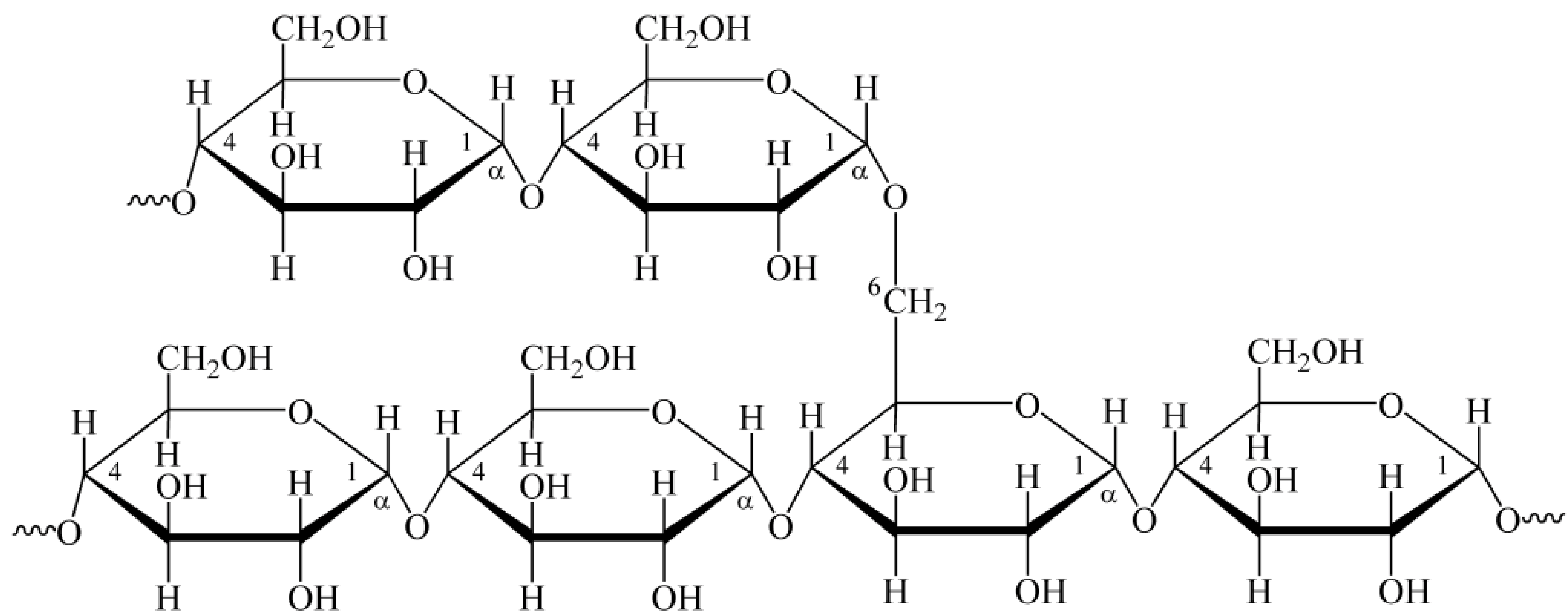


图 6.23　支链淀粉

图 6.24 给出了 α-淀粉酶和 β-淀粉酶作用于淀粉的部位,但 α(1→6)糖苷键不是两种淀粉酶的底物。当支链淀粉经淀粉酶催化水解后,留下了一个称为极限糊精(limit dextrins)的高度分支的核。此时极限糊精要进一步降解,只能在去支酶将分支点 α(1→6)水解后进行。

2. 糖原

糖原是在动物和细菌中发现的储存多糖,常称为动物淀粉。糖原的结构类似于支链淀粉,但带有的分支更多,约沿着 α(1→4)链每隔 8～10 葡萄糖残基就出现一个分支。糖原分子比淀粉分子大,可含高达 50 000 个葡萄糖残基。

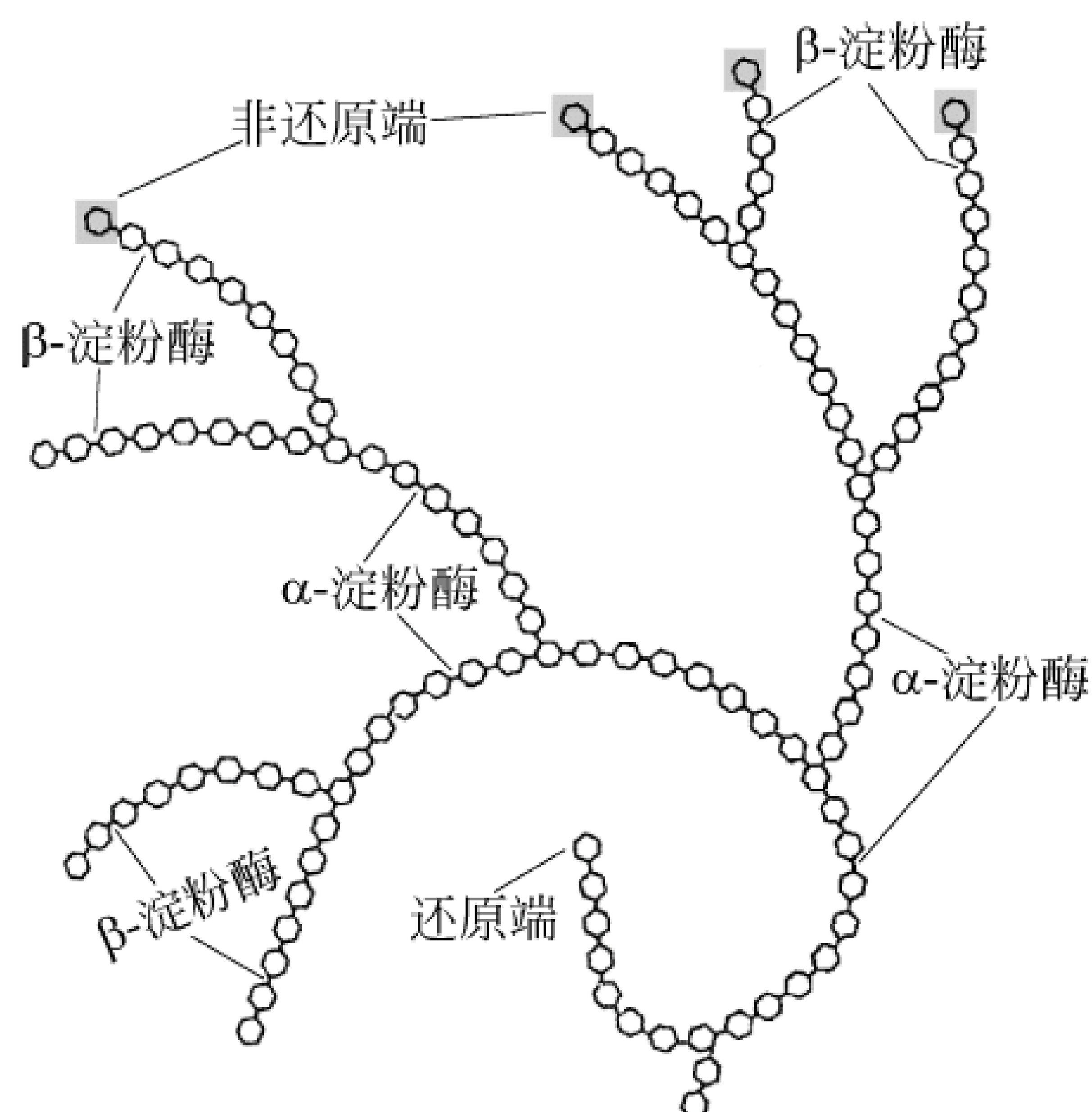


图 6.24 淀粉酶作用于支链淀粉的部位

α-淀粉酶随机作用于内部 α(1→4)糖苷键,β-淀粉酶作用于非还原端。支链淀粉只有一个还原端

在哺乳动物中糖原以糖原颗粒(glycogen granule)形式存在于胞质溶胶,主要储存于肝和骨骼肌中,分别被称为肝糖原和肌糖原,含量可占到肝湿重的10%和骨骼肌湿重的2%。

6.3.2 结构多糖:纤维素、几丁质和糖胺聚糖

结构多糖与储能多糖从组成上看是类似的,但这两类多糖特性显著不同。结构多糖不是用于储能,而是为有机体提供物理结构和强度。

1. 纤维素

纤维素(cellulose)为一种结构多糖,是植物细胞壁的主要成分。纤维素占生物圈中有机物质的50%以上。与位于细胞内的储存多糖不同,纤维素和其他结构多糖是在细胞内合成,然后分泌到细胞外的分子。纤维素是葡萄糖残基聚合形成的同多糖,但葡萄糖残基之间是通过β(1→4)糖苷键连接的,纤维二糖可看作是它的二糖单位(图 6.25)。

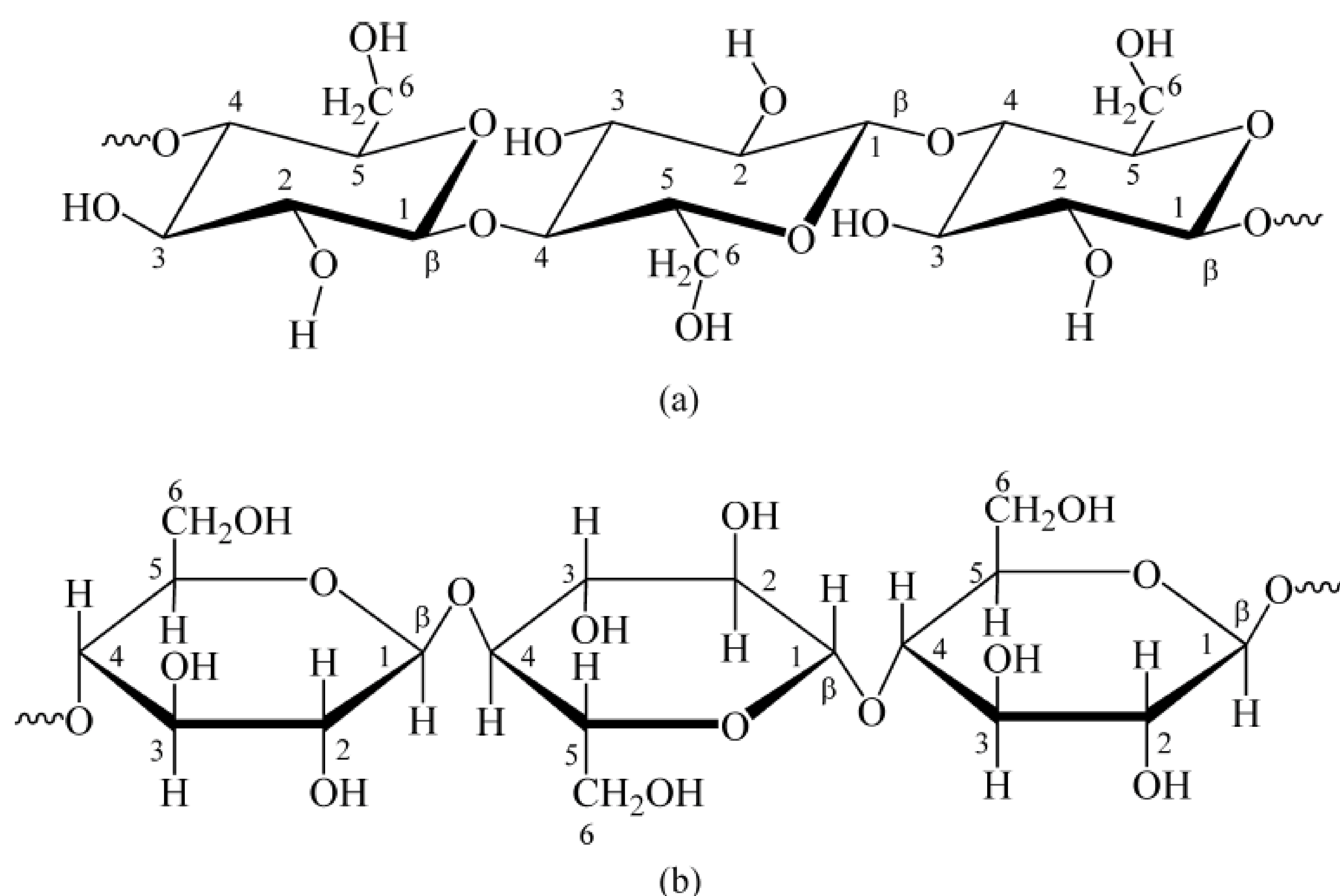


图 6.25 纤维素结构

(a) 椅式构象;(b) Haworth 透视式

纤维素的β糖苷键使得每个葡萄糖残基相对于毗邻的残基旋转了180°,形成一个刚性伸展的构象,链内和链间的大量氢键网络将葡聚糖链结合在一起形成纤维束。纤维素纤维不溶于水,具有一定的强度和刚性。棉花纤维几乎都是纤维素,而木材纤维有一半是纤维素。

催化α(1→4)糖苷键水解的α淀粉酶和β淀粉酶不能水解纤维素,只有纤维素酶(cellulase)能够水解纤维素β(1→4)糖苷键。人和其他动物可以降解淀粉、糖原、乳糖和蔗糖,但由于缺少纤维素酶不能消化纤维素。食草的反刍动物(例如牛和羊)胃中含有能生产纤维素酶的微生物,因此反刍动物通过吃富含纤维素的草和其他植物可获得葡萄糖。

2. 几丁质

几丁质(chitin)是在无脊椎动物,如甲壳虫、昆虫和蜘蛛外骨骼中发现的结构同多糖,也存在于大多数真菌和许多藻类的细胞壁中。几丁质类似于纤维素,也是一个线性聚合物,由重复的β(1→4)连接的*N*-乙酰葡糖胺(*N*-acetylglucosamine, GlcNAc)残基组成(图6.26)。

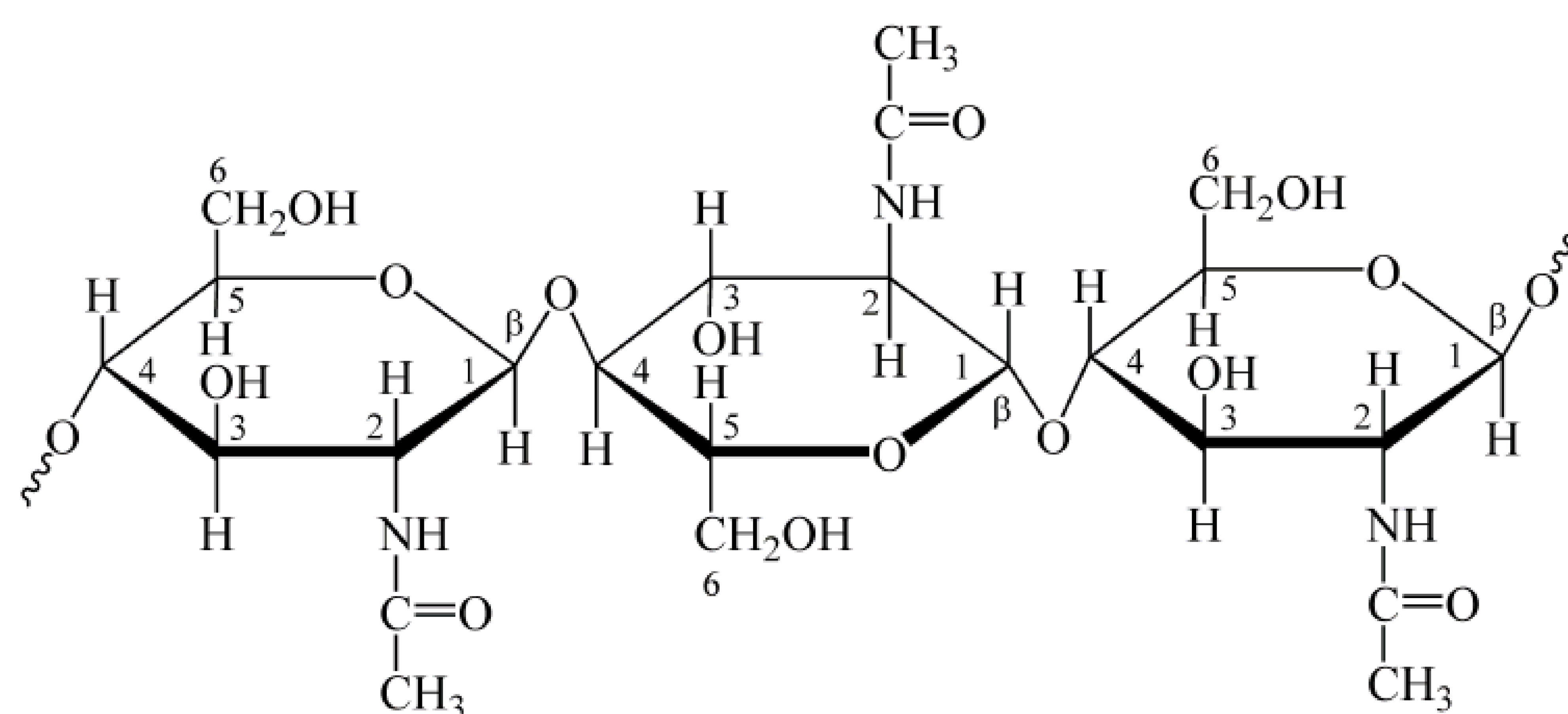


图6.26 几丁质结构

每个GlcNAc相对于毗邻的残基旋转180°,几丁质相邻链中的GlcNAc残基彼此之间形成氢键,形成具有很大强度的线性原纤维。几丁质常与非多糖化合物,例如蛋白质和无机材料紧密结合在一起。几丁质的部分去乙酰化可以生成脱乙酰壳多糖(chitosan),可用作处理废水和工业废液的吸附剂,也可用作食品保存或美容的面膜等。

3. 糖胺聚糖

糖胺聚糖(glycosaminoglycans)是细胞外基质的一组结构杂多糖,也称为黏多糖(mucopolysaccharides)。糖胺聚糖似黏液样物质遍布于像软骨、肌腱、皮肤和血管壁等结缔组织细胞外空隙,形成黏度和弹性都很高的胶状基质,胶原蛋白和其他蛋白质都包埋在胶状基质中。糖胺聚糖和胶原蛋白等交织成网,为营养物和氧分子扩散到细胞提供通道。

图6.27给出了几种糖胺聚糖的二糖重复单元,此外还有另一个硫酸位置不同的角质素-4-硫酸以及硫酸皮肤素等糖胺聚糖。这些糖胺聚糖由于含有大量的硫酸根和羧酸基团,因此带有大量负电荷,所以易于与阳离子和水分子结合。

透明质酸(hyaluronic acid)是组成软骨和肌腱等结缔组织、关节液和眼睛中玻璃体的主要糖胺聚糖,由250~25 000个的二糖单元组成,二糖单位又由*D*-葡糖醛酸与*N*-乙酰-*D*-葡糖胺通过β(1→3)糖苷键连接而成。

硫酸软骨素(chondroitin sulfate)(软骨素-6-硫酸)由*D*-葡糖醛酸与*N*-乙酰-*D*-半乳糖糖胺-6-硫酸通过β(1→3)糖苷键连接而成。硫酸软骨素赋予软骨、肌腱、韧带和血管壁一定

的弹性。

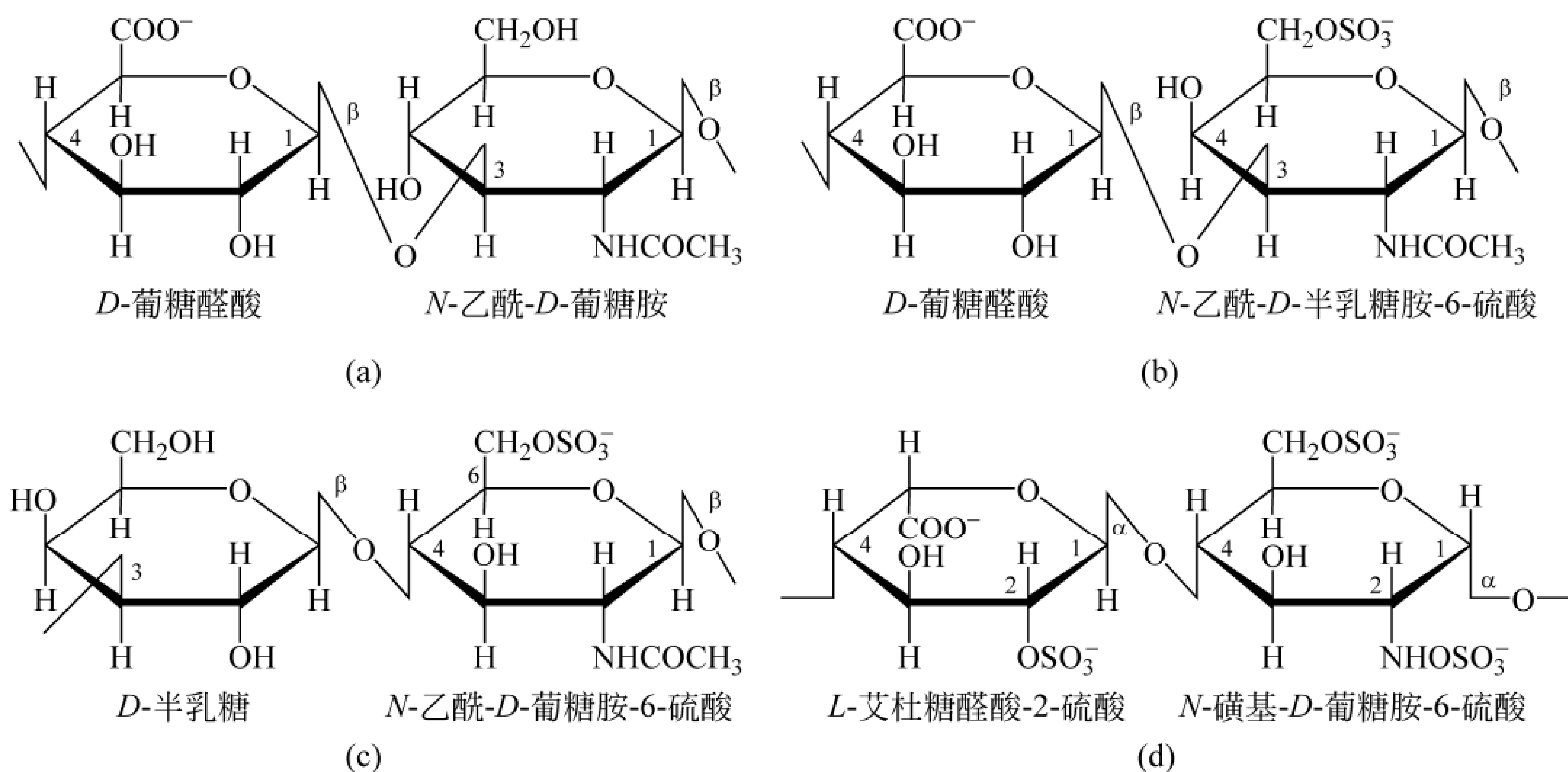


图 6.27 几种糖胺聚糖的二糖重复单元

(a) 透明质酸；(b) 硫酸软骨素(软骨素-6-磷酸)；(c) 硫酸角质素；(d) 肝素

硫酸角质素(keratan sulfate)由 *D*-半乳糖与 *N*-乙酰-*D*-葡糖胺-6-硫酸通过 β(1→4)糖苷键连接而成，广泛存在于角膜、软骨、骨骼和各种死细胞形成的如头发、指甲和脚爪等角状结构中。

硫酸皮肤素(dermatan sulfate)由 *L*-艾杜糖醛酸与 *N*-乙酰-*D*-半乳糖胺-4-硫酸通过 α(1→3)糖苷键连接而成。硫酸皮肤素使得皮肤、血管和心脏瓣膜具有适当的柔韧性。

肝素(Heparin)由 *L*-艾杜糖醛酸-2-硫酸与 *N*-磺基-*D*-葡糖胺-6-硫酸通过 α(1→4)糖苷键连接而成。肝素与其他糖胺聚糖不同，它不是结缔组织的组成成分，而是由柱状细胞分泌进入血液的一种天然抗凝血剂。肝素激活抗凝血酶Ⅲ，可防止血液凝固。输血时加入肝素可防止血液凝固。

6.4 复合糖

前面讨论的多糖都是纯粹的同多糖或杂多糖，不含有其他例如蛋白质、肽等非糖成分。实际上生物体内糖还共价结合着许多其他非糖成分，通常将这样的糖称为复合糖或糖缀合物(complex carbohydrate 或 glycoconjugate)。

复合糖分为蛋白聚糖、肽聚糖和糖蛋白 3 种类型，其中的糖成分大多为杂多糖。很多复合糖在细胞之间的相互识别、黏附、发育过程中的细胞迁移、血液凝固、免疫反应和愈伤过程中发挥着重要的作用。

6.4.1 蛋白聚糖

蛋白聚糖是蛋白质与一个或数个糖胺聚糖在细胞外基质中通过共价和非共价键结合、聚集形成的一组多样化大分子。蛋白聚糖是软骨等结缔组织的主要成分，可为结缔组织提供一定的强度和弹性。

电子显微镜照片显示软骨中的蛋白聚糖有着形状像实验室中瓶刷子那样的分子结构(图 6.28)。一条透明质酸链穿过聚集体,每一个“刷毛”可看作是一个蛋白聚糖单体,它以非共价键结合在透明质酸链上。蛋白聚糖单体都是由核心蛋白(corn protein)与硫酸角质素和硫酸软骨素等糖胺聚糖共价结合构成,而核心蛋白通过非共价键结合在透明质酸链上。连接蛋白(link protein)通过与透明质酸和核心蛋白相互作用(主要是静电作用)稳定透明质酸与核心蛋白相互作用。

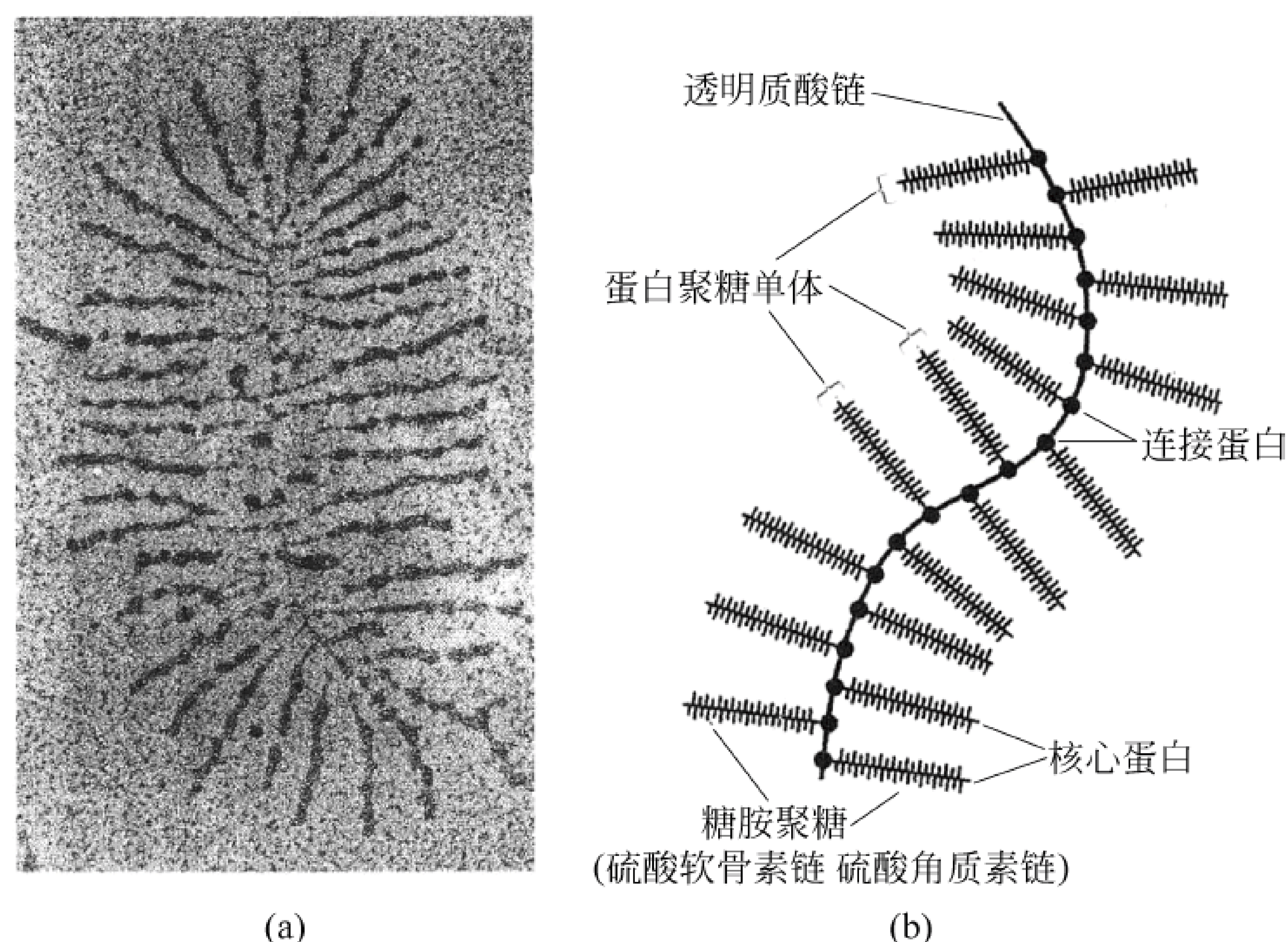


图 6.28 软骨蛋白聚糖

(a) 电子显微镜照片;(b) 结构示意图

一条长度为 400~4000nm 的透明质酸链可结合 100 多个核心蛋白,每个核心蛋白结合约 50 条硫酸角质素链和约 100 条硫酸软骨素链,而每条硫酸角质素链由约 250 个二糖单位构成,每条硫酸软骨素链由 1000 个二糖单位构成。

由于软骨是由胶原蛋白纤维形成的网状结构,其中充满了蛋白聚糖,不仅具有弹性,而且由于含有硫酸,带负电荷,所以是高度亲水的。如果软骨受到压迫,水从蛋白聚糖被挤出,当压力取消后,水又重新进入蛋白聚糖中。软骨缺乏血管,完全靠身体运动造成的体液流动来滋养,因此不好运动的人,或长时间不运动的人会导致软骨变薄、变脆。

6.4.2 肽聚糖

细菌有一个坚硬的细胞壁,维持着细菌有一定的形状和保护它的脆弱的质膜以避免渗透压波动带来的影响。根据是否吸收革兰染料,而将细菌分为革兰阳性菌和革兰阴性菌。革兰阳性菌的细胞壁比革兰阴性菌的壁厚,它们细胞壁的主要成分是连有一个肽的肽聚糖(peptidoglycan)(图 6.29)。

肽聚糖是由 *N*-乙酰葡糖胺(*N*-acetylglucosamine,GlcNAc)和 *N*-乙酰胞壁酸(*N*-acetymuramic acid,MurNAc)通过 β(1→4)键交替连接形成的杂多糖,其中 MurNAc 连接着相关的肽(图 6.30)。MurNAc 是一个 9 碳糖,由 *D*-乳酸通过醚键连接在 GlcNAc 的 C-3 上。除了 GlcNAc 分子被另外的乳酸基成分修饰外,聚糖成分非常类似于几丁质。

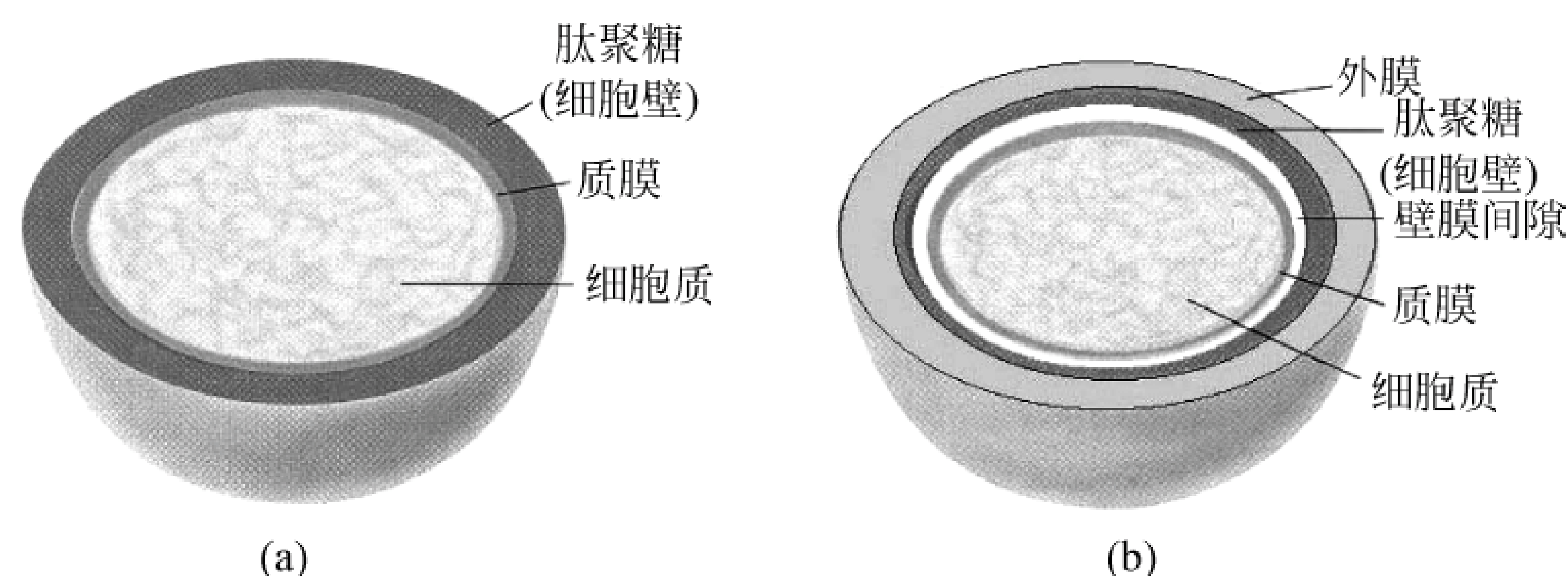


图 6.29 革兰阳性菌和革兰阴性菌细胞壁结构

(a) 革兰阳性菌；(b) 革兰阴性菌

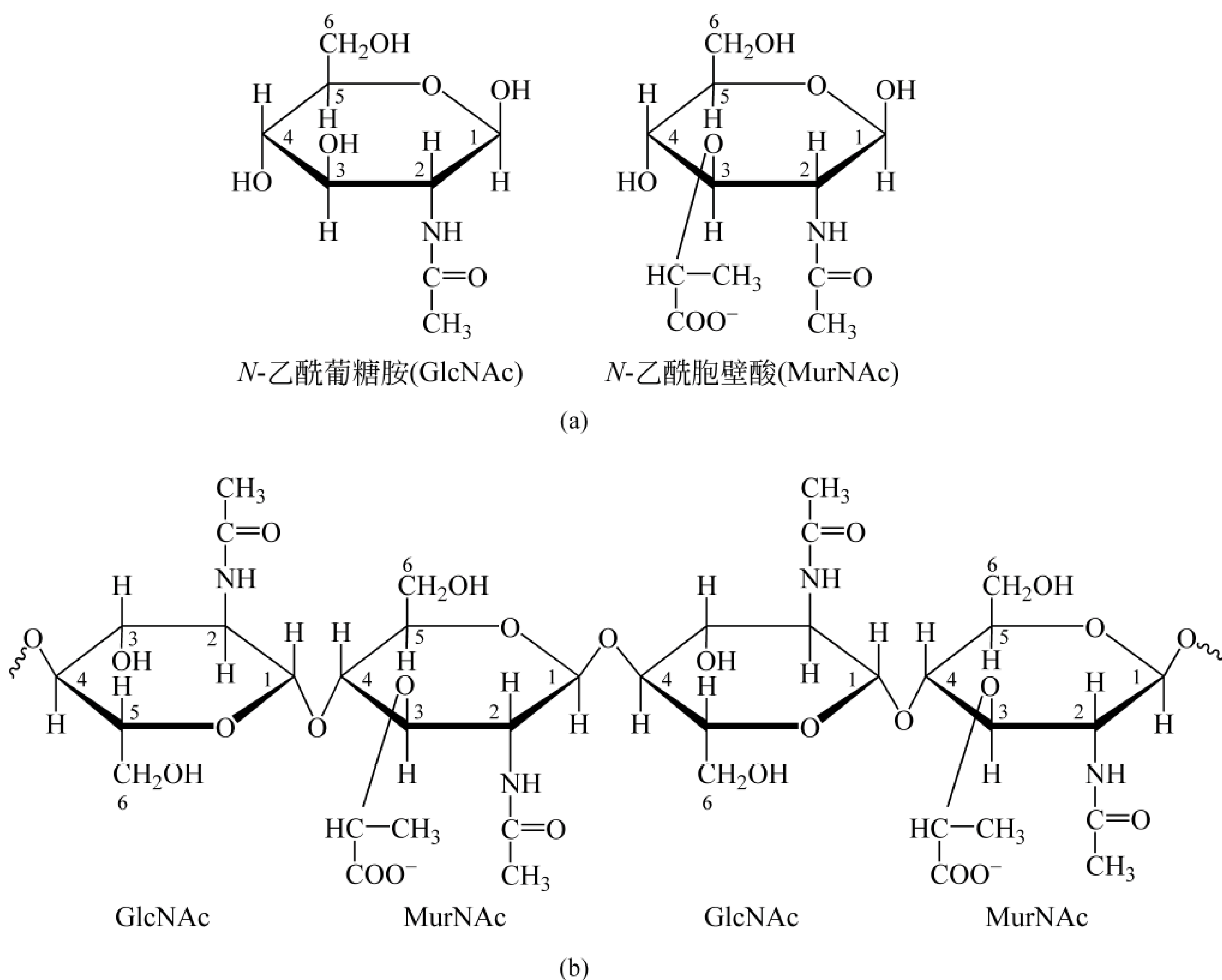


图 6.30 肽聚糖中的聚糖片段

(a) *N*-乙酰葡糖糖胺(GlcNAc)和 *N*-乙酰胞壁酸(MurNAc)单体结构；(b) 肽聚糖中的聚糖片段结构

革兰阳性菌金黄色葡萄球菌中肽聚糖的肽成分是一个序列为 *L*-Ala-*D*-Isoglu-*L*-Lys-*D*-Ala 的四肽，其中 Isoglu 代表异谷氨酸，它通过 γ-羧基与 *L*-赖氨酸形成酰胺键。四肽与聚糖的连接是通过 *L*-丙氨酸与重复二糖单元 GlcNAc-MurNAc 中的 MurNAc 乳酸基形成的酰胺键，四肽通过一个由 5 个甘氨酸残基组成的连接肽与相邻的肽聚糖分子上的另一个四肽交联(图 6.31)。伸展的交联肽聚糖赋予细胞壁以适度的刚性。

溶菌酶可以催化肽聚糖的 MurNAc 和 GlcNAc 之间的 β(1→4)键水解，使细胞壁降解，暴露出原生质体(没有了细胞壁的细菌)。由于没有了细胞壁的保护，渗透压的微小变化都有可能引起原生质体的破裂。

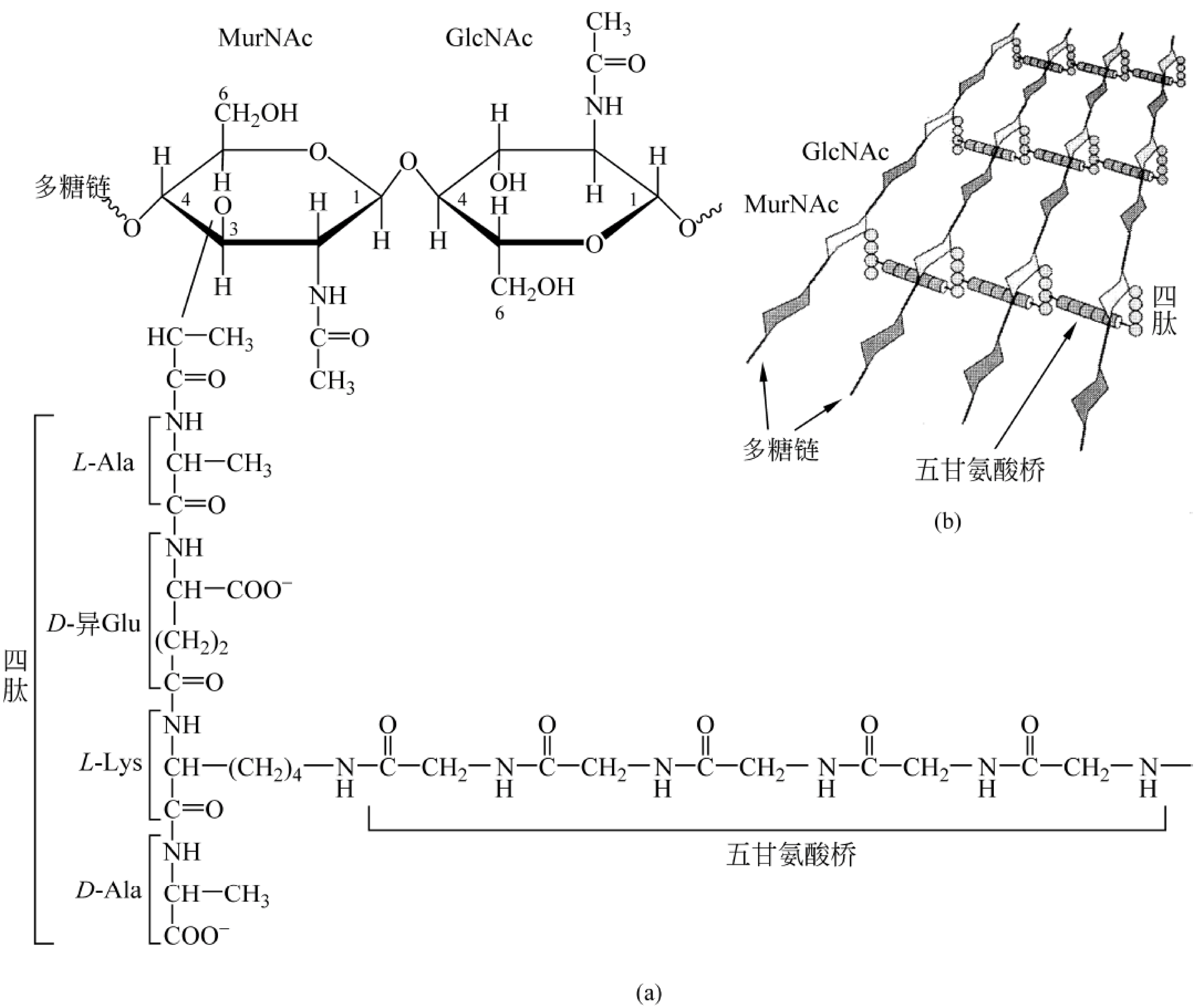


图 6.31 金黄色葡萄球菌中肽聚糖的结构

(a) 肽聚糖的重复二糖单元 GlcNAc-MurNAc，MurNAc 的乳酸基通过酰胺键与四肽相连；(b) 金黄色葡萄球菌细胞壁的肽聚糖

相关话题 青霉素

1928 年弗莱明(Alexander Fleming)发现细菌培养板偶然被特异青霉菌(*Penicillium notatum*)污染后，霉菌附近的细菌被裂解。原来是霉菌分泌的一种抗生素——青霉素(penicillin)导致细菌裂解。青霉素真正分离和临床应用是于 1941 年由弗洛里和钱恩完成的。

青霉素杀菌是由于青霉素的结构类似于催化肽聚糖合成的转肽酶的底物末端的二肽 *D*-Ala-*D*-Ala(图 6.32)。青霉素结合在转肽酶的活性部位，抑制酶活性，阻止了肽聚糖的进一步合成，也就抑制了细菌细胞壁的合成。

有很多抗生素都可以抑制肽聚糖生物合成的特定反应。青霉素只对某些细菌有效，但对真核细胞没有影响。青霉素对革兰阳性菌比对革兰阴性菌更有效，因为革兰阴性菌更多地依靠其他化合物构建它的细胞壁。

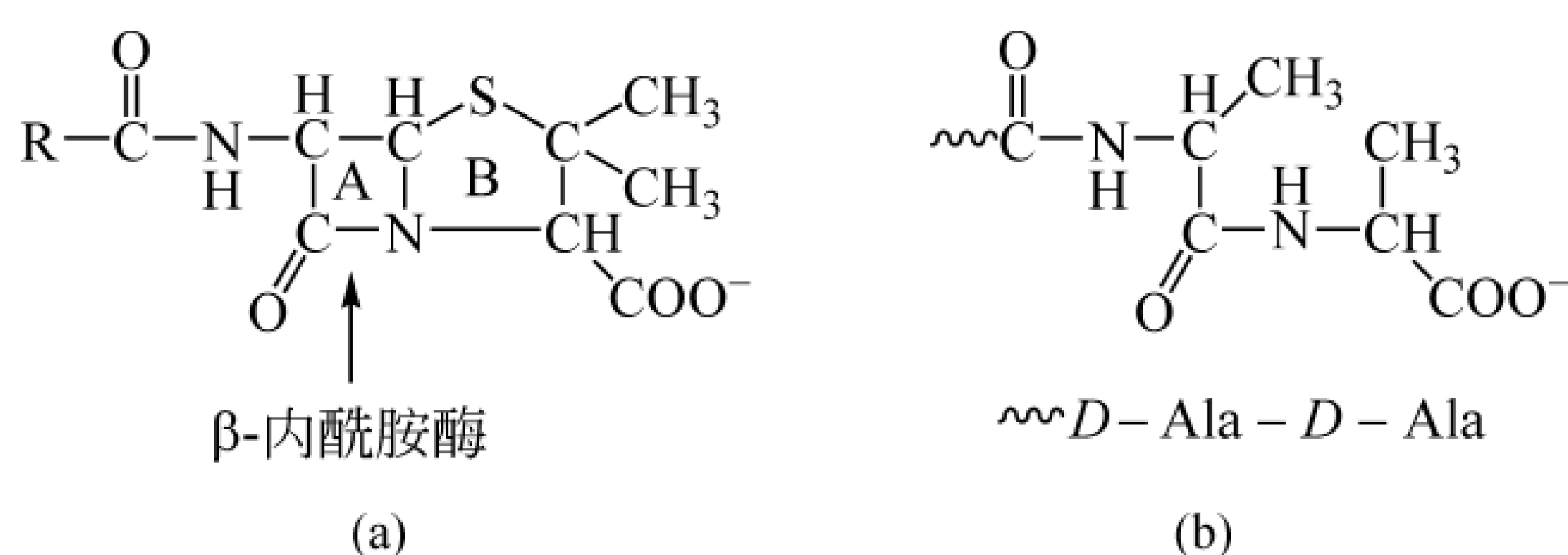


图 6.32　青霉素结构

(a) 青霉素中的β-内酰胺酶作用位点；(b) 转肽酶作用的底物肽聚糖末端的二肽 *D*-Ala-*D*-Ala

对青霉素有抗性的细菌由于含有β-内酰胺酶(青霉素酶),该酶可以催化青霉素的β-内酰胺环开环,导致青霉素失活。编码β-内酰胺酶的基因位于青霉素抗性细菌的质粒中。

6.4.3　糖蛋白

生物体内带有寡糖链或多糖链的蛋白称为糖蛋白,但糖的比例要比蛋白聚糖和肽聚糖少得多。按照糖链与蛋白连接的方式,糖蛋白可分为*O*-联糖蛋白(*O*-linked glycoprotein)、*N*-联糖蛋白(*N*-linked glycoprotein)(图 6.33)。

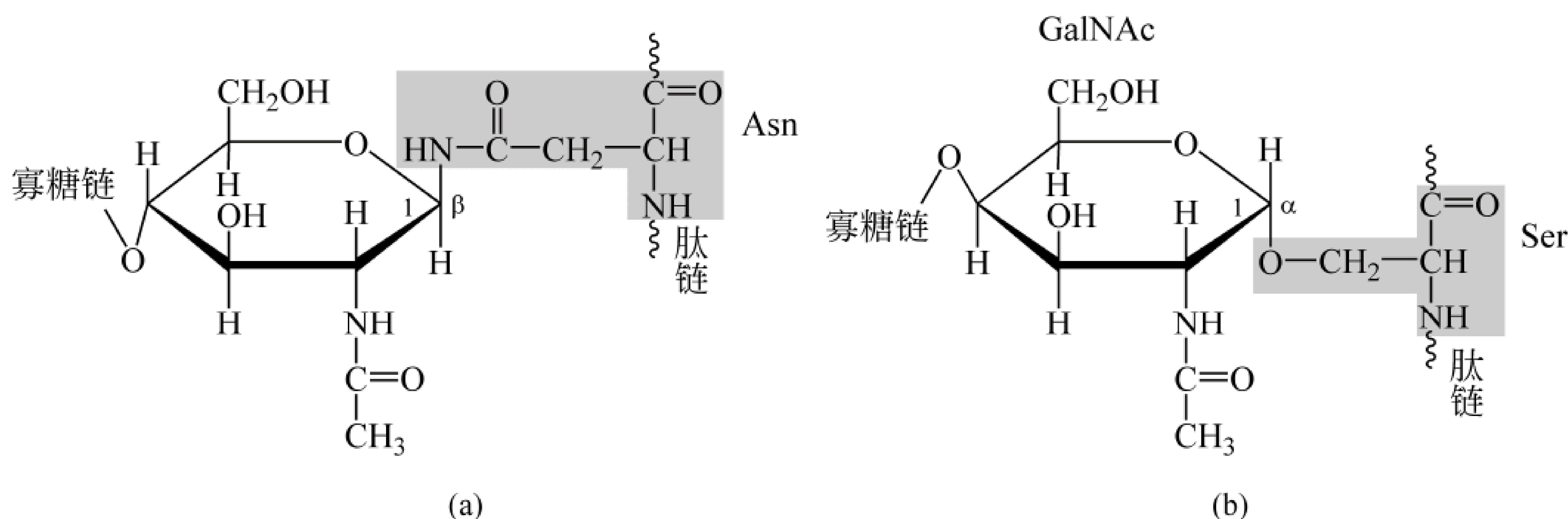


图 6.33　糖蛋白

(a) *N*-联糖蛋白；(b) *O*-联糖蛋白

1. *N*-联糖蛋白

在*N*-联糖蛋白中,一般都是聚糖中的*N*-乙酰葡糖胺(GlcNAc)或*N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)通过*N*-糖苷键与肽链中的一个天冬酰胺(Asn)残基相连[图 6.31(a)]。在免疫球蛋白 G(IgG)中*N*-联聚糖种类多达 30 余种,都具有不同的功能,缺失会引发不同的疾病,如类风湿关节炎、红斑狼疮等。

2. *O*-联糖蛋白

在大多数*O*-联糖蛋白中,都是聚糖中的*N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与肽链中一个丝氨酸或苏氨酸残基侧链的羟基之间形成的*O*-糖苷键相连的[图 6.31(b)]。例如生活在南极海洋中的鱼都含有一种"抗冻"的糖蛋白,称为鱼抗冻蛋白(fish antifreeze protein)[属于黏蛋白(mucins)],其寡糖部分 Gal-GalNAc 通过*O*-糖苷键与蛋白中 Thr 连接。鱼抗冻蛋白使得鱼即使在极冰冷的海水中也可以防止体液凝固。

相关话题　ABO 血型

人们所熟悉的O、A和B血型的区别在于血型抗原的不同,在大多数灵长类动物中这些抗原是位于它们细胞表面的3种类型不同的*O*或*N*联的寡糖组分(图6.34)。O型血人含有H抗原,A酶(A型血人)将GalNAc加到H抗原Gal的3位上形成A抗原,B酶(B型血人)加Gal形成B抗原,两种酶都是糖基化酶。不用说,AB型抗原包括了A型抗原和B型抗原。

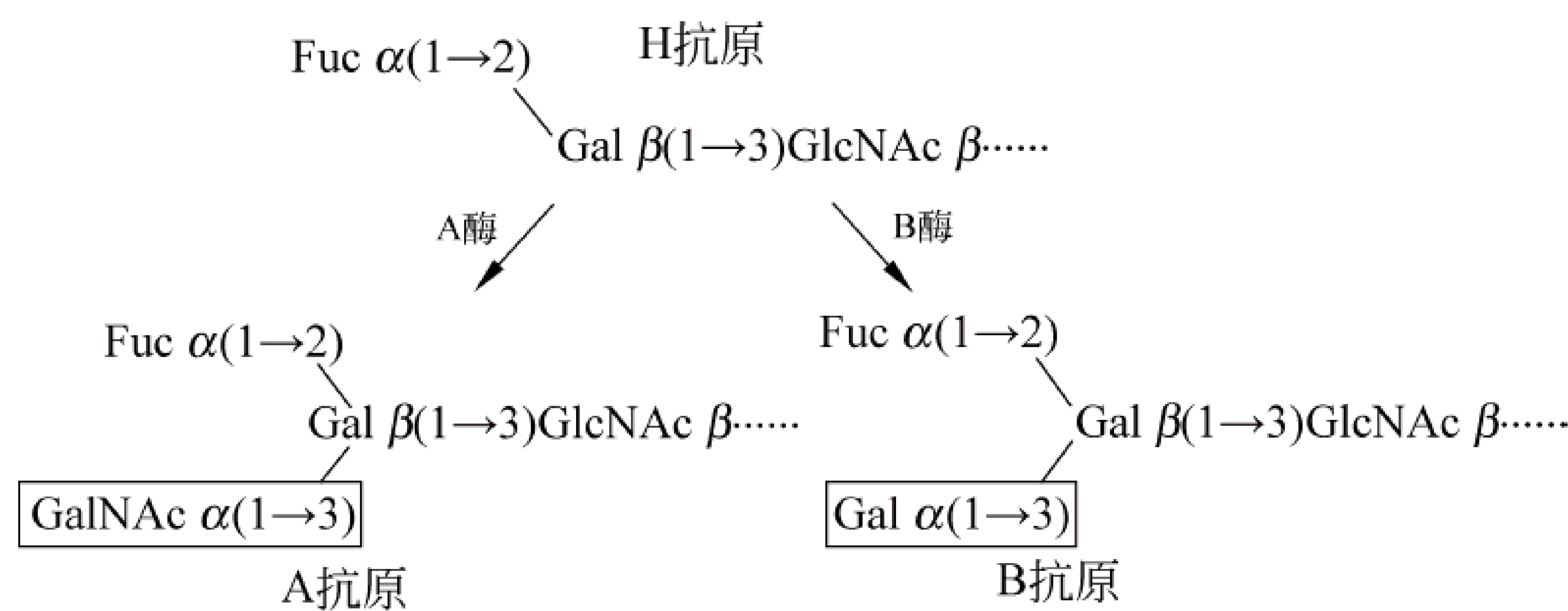


图 6.34　血型抗原

GlcNAc:*N*-乙酰葡糖胺,Gal:半乳糖,　Fuc:果糖,GalNAc:*N*-乙酰半乳糖胺

具有A型抗原的个体,血液中含有抗B抗体;有B型抗原的血液含有抗A抗体。同时含有A抗原和B抗原的AB型血个体的血液中,既没有抗A抗体,也没有抗B抗体。但O型血个体,虽然不携带A抗原,也不携带B抗原,但其血液中含有抗A抗体和抗B抗体。因此如果将A型血输给B型血个体,那么A型血红细胞就会与B型血个体血液中的抗A抗体发生抗原-抗体反应,引起输入的红细胞凝集,导致致死性血管堵塞。

小结

1. 糖分为单糖、寡糖和聚糖。单糖又分为醛糖和酮糖或它们的衍生物。根据离开羰基碳最远的手性碳构型又分为*D*-构型和*L*-构型。每个单糖可能具有2^n个立体异构体(n为手性碳数)。

2. 碳原子至少5个的醛糖和至少6个的酮糖主要存在着像呋喃糖和吡喃糖那样的环化半缩醛或半缩酮。在环状结构中异头碳的构型又分有α构型或β构型。

3. 单糖经化学或酶学反应可生成相应的衍生物,例如糖酸、糖醇、脱氧糖、糖酯、氨基糖和糖苷等。

4. 糖苷是由一个糖的异头碳与另一分子形成糖苷键时生成的。糖苷包括二糖、聚糖和一些糖的衍生物。

5. 同多糖是含有单一类型糖残基的聚合物。例如储存多糖淀粉和糖原,以及结构多糖

纤维素和几丁质。

6. 杂多糖含有一种类型以上糖残基。杂多糖常出现在包括蛋白聚糖、肽聚糖和糖蛋白在内的复合多糖中。

7. 蛋白聚糖是一种连有重复二糖单位的蛋白质。蛋白聚糖主要出现在细胞外基质和例如软骨那样的结缔组织中。

8. 肽聚糖是连有肽的复合糖，许多细菌的细胞壁都是由肽聚糖组成的。

9. 糖蛋白是含有共价连有寡糖的蛋白质，大多数糖蛋白的寡糖链或是通过 *O*-糖苷键与丝氨酸或苏氨酸残基相联，或是通过 *N*-糖苷键与天冬酰胺残基相联，在结构和糖组成上表现出极大的多样性。

习题

1. 一个吡喃葡糖和一个呋喃果糖各有多少个立体异构体？各有多少 *D* 型糖，*L* 型糖？

2. 尽管葡萄糖溶液中的主要形式是 β-*D*-葡萄糖（63％），而 α-*D*-葡萄糖占 36％，但结晶的葡萄糖几乎是由 α-*D*-葡萄糖组成。怎样解释这一差别？

3. 在测血糖时，要将一滴血加到浸透了如下反应所需的葡糖氧化酶和试剂的纸条上。纸的颜色变化指示出存在多少葡萄糖。葡糖氧化酶对 β-*D*-葡萄糖是特异的，但为什么能够测出整个血糖？



β-*D*-葡萄糖 + O_2 ⟶ *D*-葡糖酸内酯 + H_2O_2

4. 蜂蜜中的 *D*-果糖主要是 β-*D*-吡喃型果糖（67％）和 β-*D*-呋喃型果糖（25％）等几种形式果糖的混合物，β-*D*-吡喃型果糖最甜。相比较而言，β-*D*-呋喃型果糖甜度差一些，但却最稳定。烹调和高温下放置都会使蜂蜜的甜味减弱，这是什么道理？

5. 为什么常用蔗糖，而不用葡萄糖保存水果，如水果罐头等食物呢？

6. 什么是乳糖不耐受症？不能喝鲜奶的人是否可选择喝酸奶？

7. 若要显现直链淀粉-碘复合物的特征蓝色，所需的直链淀粉最小相对分子质量应当为多少？（葡萄糖残基相对分子质量为 180）

8. (a)一个糖原分子中含有多少还原末端和非还原末端？(b)糖原是重要的燃料储备形式，最大特点是能够快速被降解和合成。你认为会在哪一端（还原末端，还是非还原末端）以最大速度进行糖原降解和合成？

9. 尽管人不能消化纤维，但是高纤维饮食的人患癌症（尤其结肠癌）的比率低，并且血液胆固醇水平也低。请举出几点纤维对人体的好处。

10. 想象你得到了含有 β-葡糖苷酶的药丸。假如服用了这个药丸后，你吃这个课本，味道像什么？如果你把它浸入到含有 β-葡糖苷酶的溶液中过夜，然后再吃，味道有什么不同吗？

11. 硫酸软骨素能够缓冲摩擦和振动，起着关节润滑剂的作用，主要是溶液中的硫酸软骨素分子所占据的体积远大于脱水状态的体积。为什么溶液状态下硫酸软骨素分子体积会增大呢？

7　脂质、生物膜与信号转导

像蛋白质和糖一样，脂质(lipid)广泛存在于所有生物体中，它也是维持生命所必需的营养物质。脂常被定义为生物系统中存在的不溶于水的(或只是微溶的)有机化合物。有些脂是疏水性分子(非极性的)，有些脂是两性分子(同时含有非极性和极性基团)。

图 7.1 给出了主要脂类之间的结构关系及分类。脂类主要分为磷脂、鞘糖脂和类异戊二烯类化合物，不仅在化学组成和结构上，而且在生物功能上都呈现出多样性。甘油磷脂和鞘磷脂是生物膜的主要结构成分。脂肪和油不仅是产能的燃料分子，而且分布于皮下的脂肪还有防止热量散发，维持动物体温的作用。类固醇类激素、脂类维生素等能调节许多代谢过程，而神经节苷脂和其他的鞘糖脂位于细胞表面，参与细胞识别。

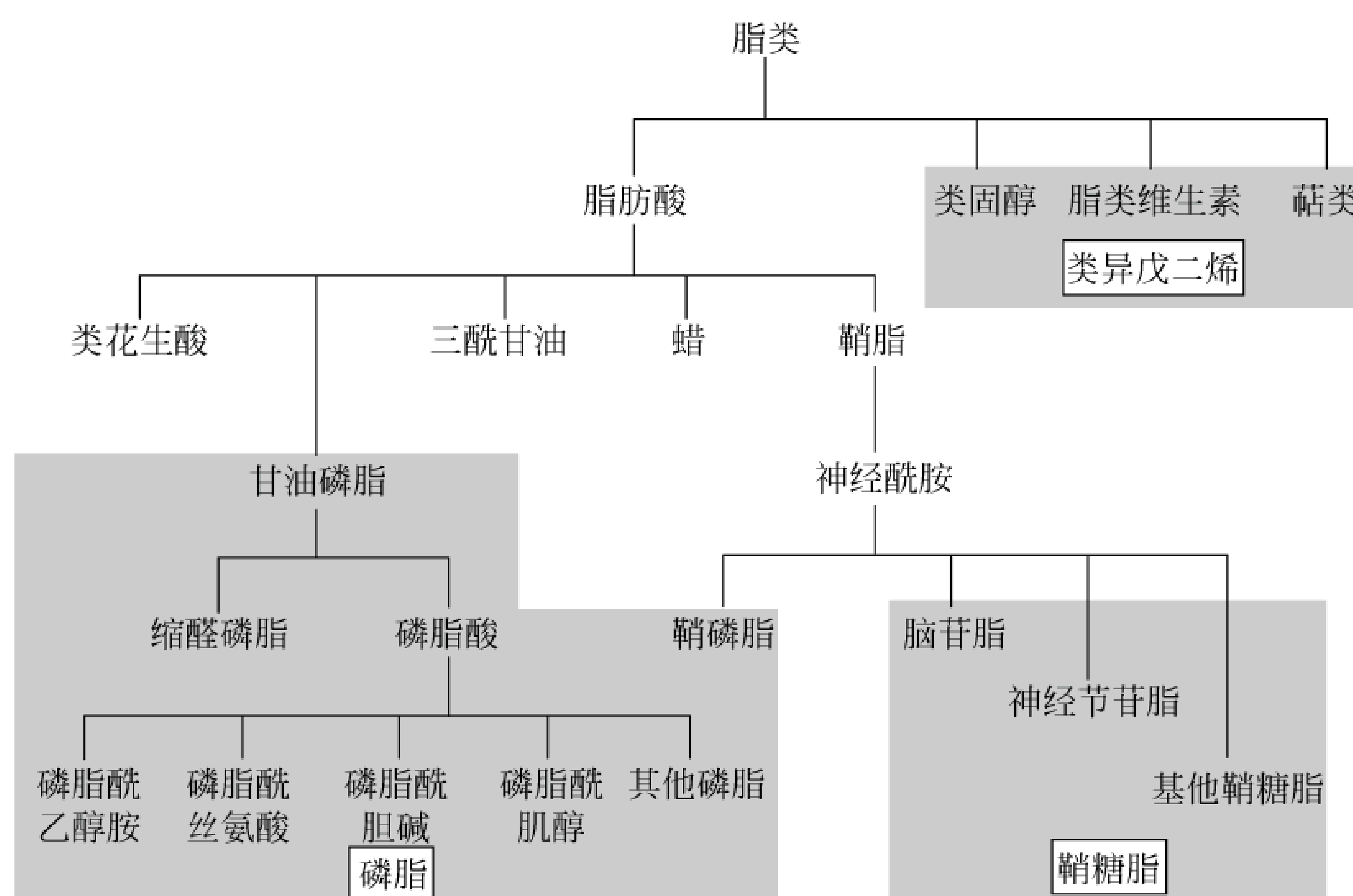


图 7.1　主要脂类之间的结构关系

甘油磷脂和鞘磷脂因含有磷酸而被归类为磷脂。脑苷脂和神经节苷脂含有鞘氨醇和糖而被归类于鞘糖脂。类固醇、脂类维生素和萜类归于类异戊二烯是因为它们的结构与五碳分子异戊二烯有关

7.1　脂肪酸

脂肪酸(fatty acid)是通式为 R-COOH 的单羧酸，R 代表烃链尾巴。表 7.1 列举了自然界中常见的一些脂肪酸，大多数脂肪酸都有一个处于 4.5～5.0 范围内的 p*K* 值，所以它们在生理 pH 下处于离子化状态。

表 7.1 自然界中常见的一些脂肪酸

糖数	常用名	系统命名	符号	结 构
饱和脂肪酸				
12	月桂酸	正十二碳烷酸	12∶0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
14	豆蔻酸	正十四碳烷酸	14∶0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
16	棕榈酸	正十六碳烷酸	16∶0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
18	硬脂酸	正十八碳烷酸	18∶0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
20	花生酸	正二十碳烷酸	20∶0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
22	山嵛酸	正二十二碳烷酸	22∶0	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
24	掬焦油酸	正二十四碳烷酸	24∶0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
不饱和脂肪酸				
16	棕榈油酸	9-十六碳单烯酸	16∶1	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
18	油酸	9-十八碳单烯酸	18∶1	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
18	亚油酸	12,15,15-十八碳二烯酸	18∶2	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$
18	α-亚麻酸	6,9,12-十八碳三烯酸	18∶3	$CH_3CH_2(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$
18	γ-亚麻酸	9,12,15-十八碳三烯酸	18∶3	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_3(CH_2)_3COOH$
20	花生四烯酸	5,8,11,14-二十碳四烯酸	20∶4	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_3COOH$
24	神经酸	15-二十四碳单烯酸	24∶1	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$

大多数脂肪酸的碳原子数处于12～20范围，几乎都是偶数。根据系统命名，脂肪酸羧基碳被指定为C-1，其余的碳依次编号。常使用希腊字母标记碳原子，与羧基毗邻的碳(C-2)被指定为α-碳，其余的碳依次用β、γ、δ和ε等字母表示，而ω特指末端碳(图7.2)。

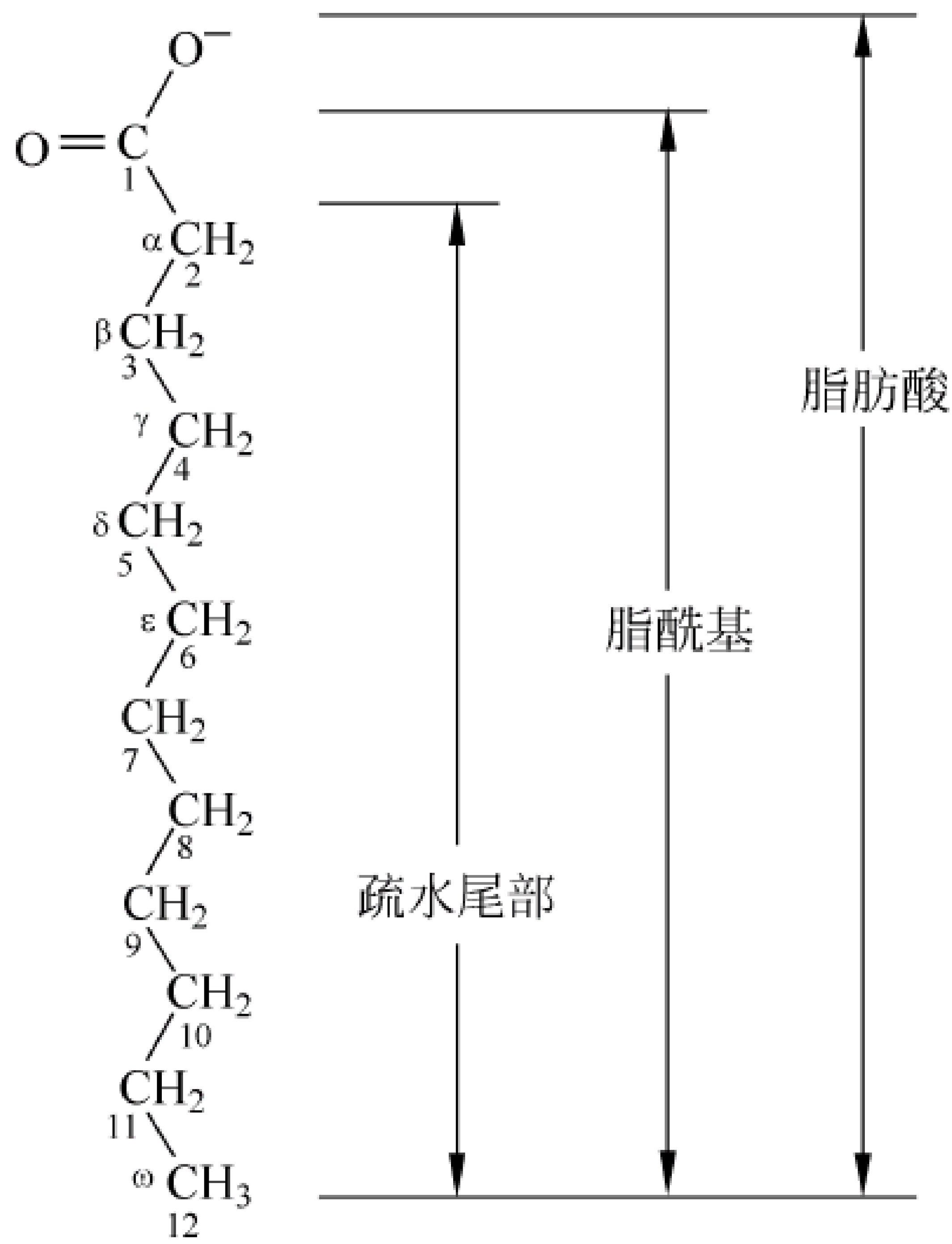


图 7.2 脂肪酸的基本结构

脂肪酸分为饱和与不饱和脂肪酸，两者的物理特性有很大的差别。饱和脂肪酸不含C=C双键，不饱和脂肪酸含有一个或多个双键，具有*cis*(顺式)构型或*trans*(反式)构型。自然界中存在的绝大多数脂肪酸的双键构型都是*cis*构型。只含一个双键称为单不饱和脂肪酸，带有两个以上双键的脂肪酸称为多不饱和脂肪酸。

图 7.3 给出了硬脂酸(18∶0)、油酸(18∶1)和亚麻酸(18∶3)结构。含有双键的油酸和亚麻酸的烃链呈现出弯曲形状的 *cis* 构型。*cis* 构型妨碍了分子之间紧密接触和有序结晶的形成,减少了烃链间范德华力相互作用,所以 *cis* 不饱和脂肪酸的熔点比饱和脂肪酸低。油酸熔点为 13℃,亚麻酸熔点为－17℃,而硬脂酸熔点高达 70℃。

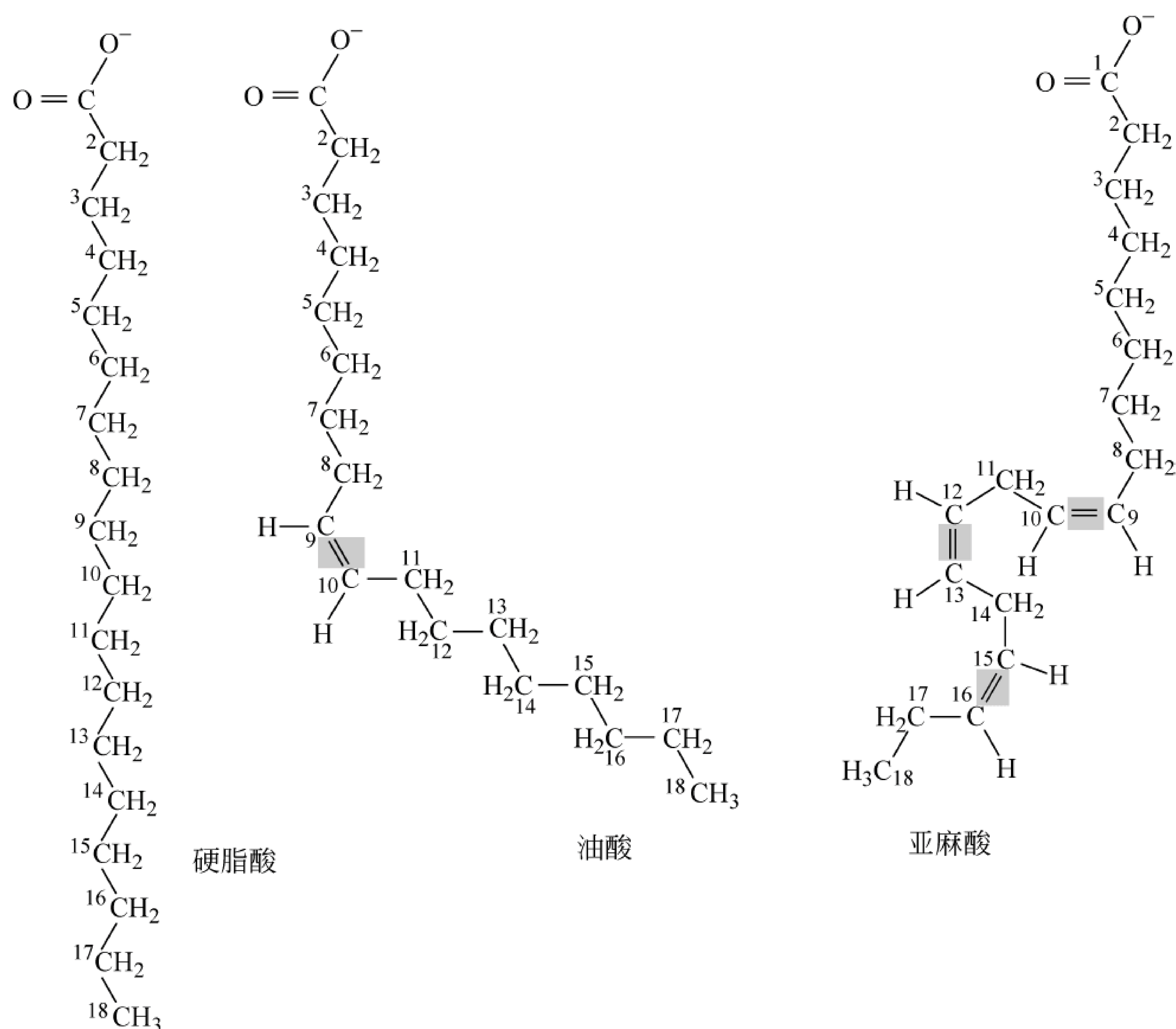


图 7.3　硬脂酸(18∶0)、油酸(18∶1)和亚麻酸(18∶3)结构

相关话题　反式脂肪酸

植物油易氧化变质,有股"哈喇"味。为防止不饱和脂肪酸氧化,又便于运输,经氢化处理使它变硬。但氢化产物包括饱和脂肪酸和反式脂肪酸(图 7.4)。一旦油类被氢化后,就会失去不饱和的性质,也就失去了它对人体健康的益处。大多数人造奶油以及所有的松糕油实际上都是由氢化过的脂肪制造的。

美国快餐、炸土豆片、烘烤食品及其他一些经过加工的食物中约含有 50% 的反式脂肪酸。反式脂肪酸对心脏和动脉的不利影响的严重程度类似饱和脂肪酸,可能增加低密度脂蛋白(LDL)中的胆固醇含量。所以,食用人造奶油(反式脂肪酸的来源)与心血管疾病的增加可能有一定的相关性。

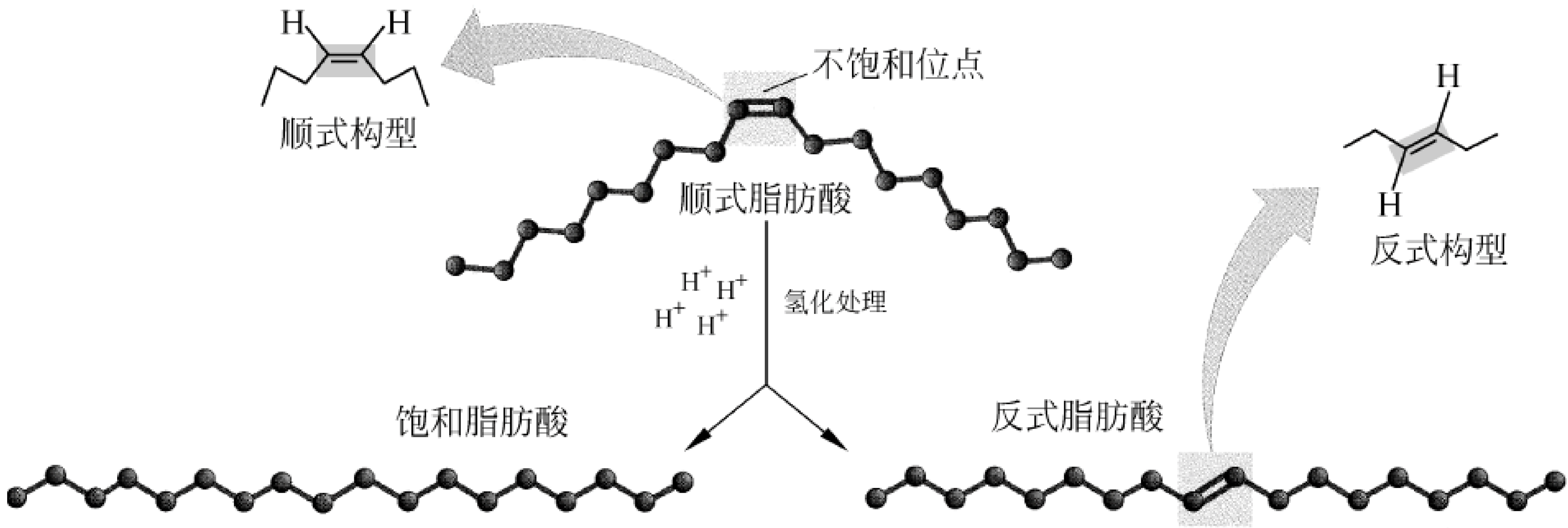


图 7.4　反式脂肪酸的生成

7.2　三酰甘油

三酰甘油（triacylglycerol）是甘油的 3 个羟基与 3 个脂肪酸形成的甘油三酯（triglyceride），为中性（非离子化）非极性（疏水）脂（图 7.5）。如果 3 个脂酰基相同，称为简单三酰甘油，而如果含有 2 个或 3 个不同的脂酰基，称为混合三酰甘油。动物中的三酰甘油主要存在于脂肪组织（体脂），体脂中也存在少量的单酰甘油和二酰甘油。绝大多数天然的植物和动物脂肪都是简单三酰甘油和混合三酰甘油的混合物。

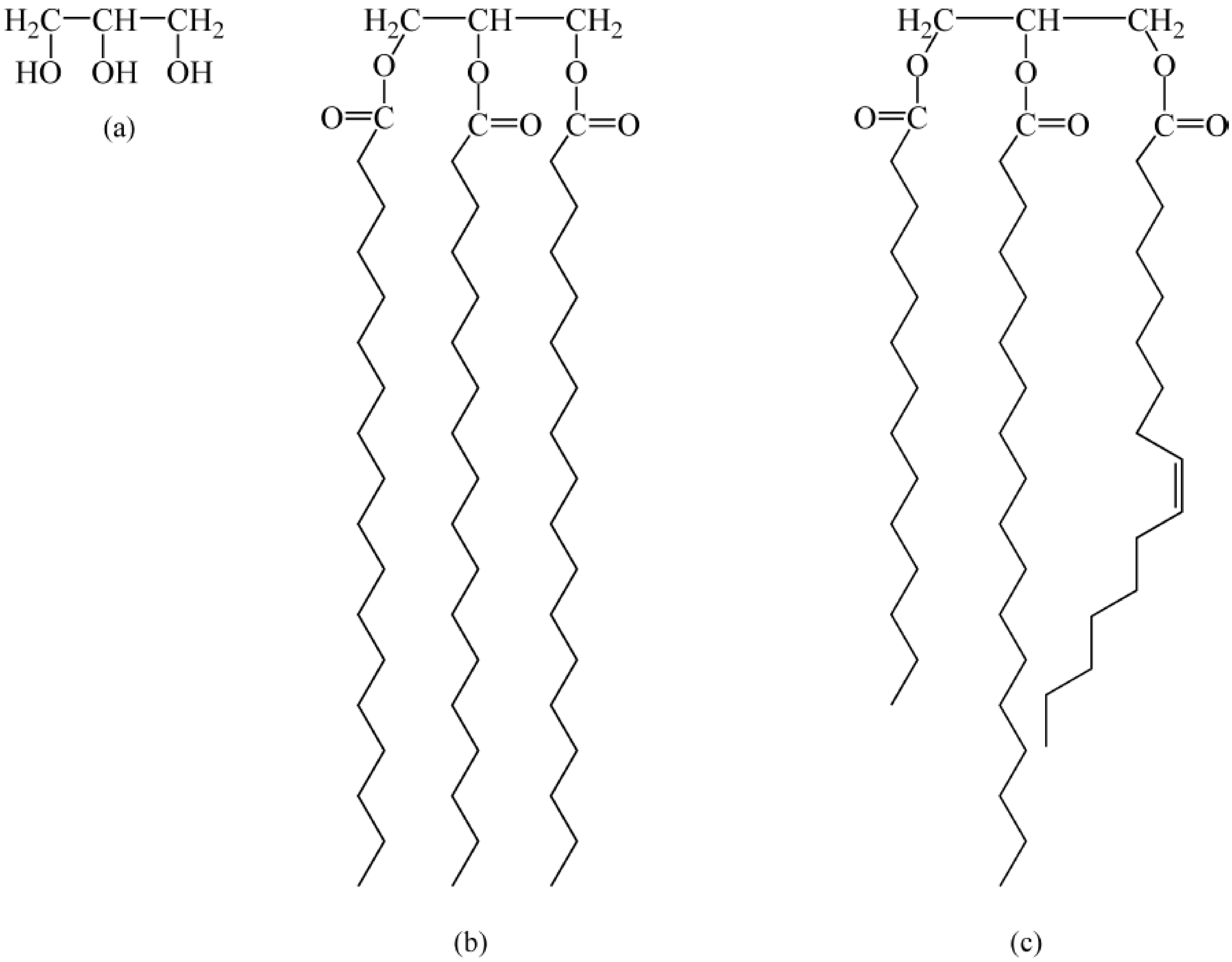


图 7.5　三酰甘油

(a) 甘油；(b) 简单的三酰甘油（三个链长相同的酰基）；(c) 混合型三酰甘油，含有两个链长不同的酰基和一个不饱和酰基

动植物油呈固态(脂肪)还是液态(油)取决于脂肪酸成分和温度。动物脂肪体温下倾向于固态,而植物油通常呈液态,尤其是多不饱和脂肪酸含量高的花生油、葵花籽油、色拉油和橄榄油等常见植物油在很低温度下仍呈液态。

7.3 甘油磷脂

甘油磷脂(glycerophospholipids)是两性分子,有一个极性头部和长的、非极性尾部。极性头部指的是磷脂分子中磷酸和与磷酸相连接的其他带电荷基团,非极性尾部指的是两个长链脂酰基。最简单的甘油磷脂是磷脂酸(phosphatidate),由甘油-3-磷酸与在C-1和C-2处成酯的两个脂酰基组成。其他的甘油磷脂可以说都是磷脂酸的衍生物,例如磷脂酸结合胆碱就生成磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)(图7.6)。

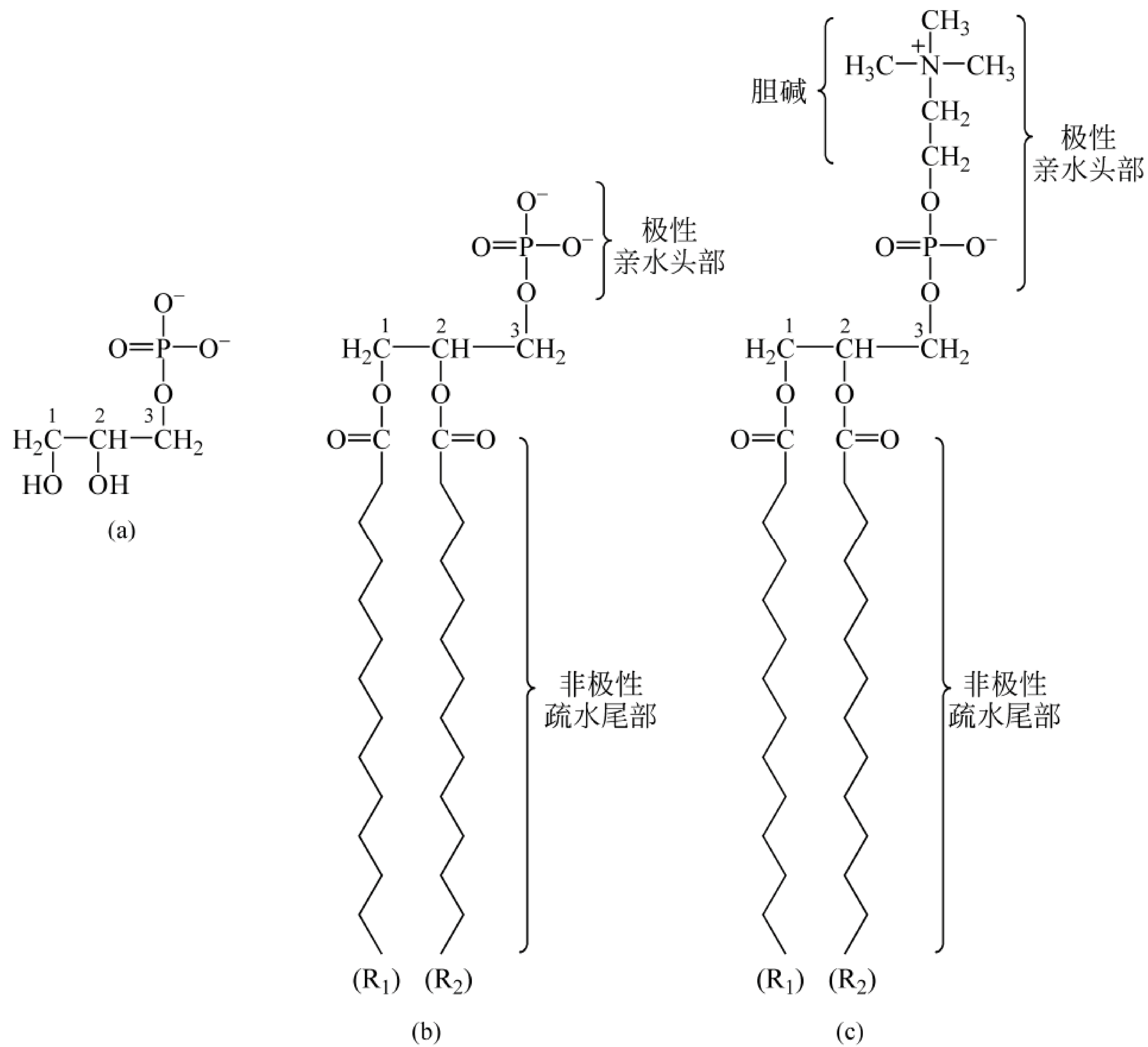


图7.6 甘油-3-磷酸和磷脂酸结构

(a) 甘油-3-磷酸;(b) 磷脂酸,含有一个极性头部磷酸,一个非极性的疏水尾部两个脂酰基;(c) 磷脂酰胆碱(或称为卵磷脂),极性头部除了磷酸外,还包括胆碱

表7.2给出了一些常见类型的甘油磷脂,但给出的每一种甘油磷脂都不是单一的一种化合物,而是具有同样极性头部和不同脂酰基的一族化合物。例如人红细胞膜至少含有21种不同的磷脂酰胆碱,它们主要区别在甘油骨架的C-1和C-2处连接的脂酰基上。通常C-1

连接的是饱和的脂肪酸，而 C-2 连接的是不饱和脂肪酸。甘油磷脂中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)和磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)是主要的生物膜脂。

表 7.2　一些常见类型的甘油磷脂

(R₁) 甘油磷脂通式 (R₂) X=余下的极性头部分

HO—X	—X	形成的甘油磷脂名称
水	—H	磷脂酸
胆碱	$-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$	磷脂酰胆碱(卵磷脂)
乙醇胺	$-CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$	磷脂酰乙醇胺
丝氨酸	$-CH_2-CH(\overset{+}{N}H_3)COO^-$	磷脂酰丝氨酸
甘油	$-CH_2CH(OH)-CH_2OH$	磷脂酰甘油
磷脂酰甘油	$-CH_2CH(OH)-CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(OCOR_4)-CH_2OCOR_3$	二磷脂酰甘油(心磷脂)
肌醇	成键位置（肌醇环，C-1 处成键）	磷脂酰肌醇

利用不同的磷脂酶可分析甘油磷脂的结构和确定组成中的各个脂肪酸(图 7.7)。磷脂酶 A_1 和 A_2 可分别催化甘油磷脂中 C-1 和 C-2 位置酯键的水解。磷脂酶 A_2 是胰液中主要的磷脂酶，可降解食物的膜磷脂，它也存在于蛇及蜂的毒液中。因此被毒蛇咬或毒蜂蜇后，生成的溶血磷脂(lysophosphoglycerides)会破坏细胞膜，导致溶血(红细胞裂解)，危及生命。磷脂酶 C 催化甘油与磷酸之间的 P—O 键，释放出二酰甘油，磷脂酶 D 可将甘油磷脂转换为磷脂酸。

缩醛磷脂(plasmalogen)是另一类型的甘油磷脂，其中一个烃链通过乙烯醚键(而不是酯键)连接在甘油 C-1 上。缩醛磷脂中常见的头部基团是乙醇胺、胆碱和丝氨酸(图 7.8)。缩醛磷脂约占人中枢神经系统中甘油磷脂的 23%，另外，在周围神经和肌肉组织中也分布着缩醛磷脂。

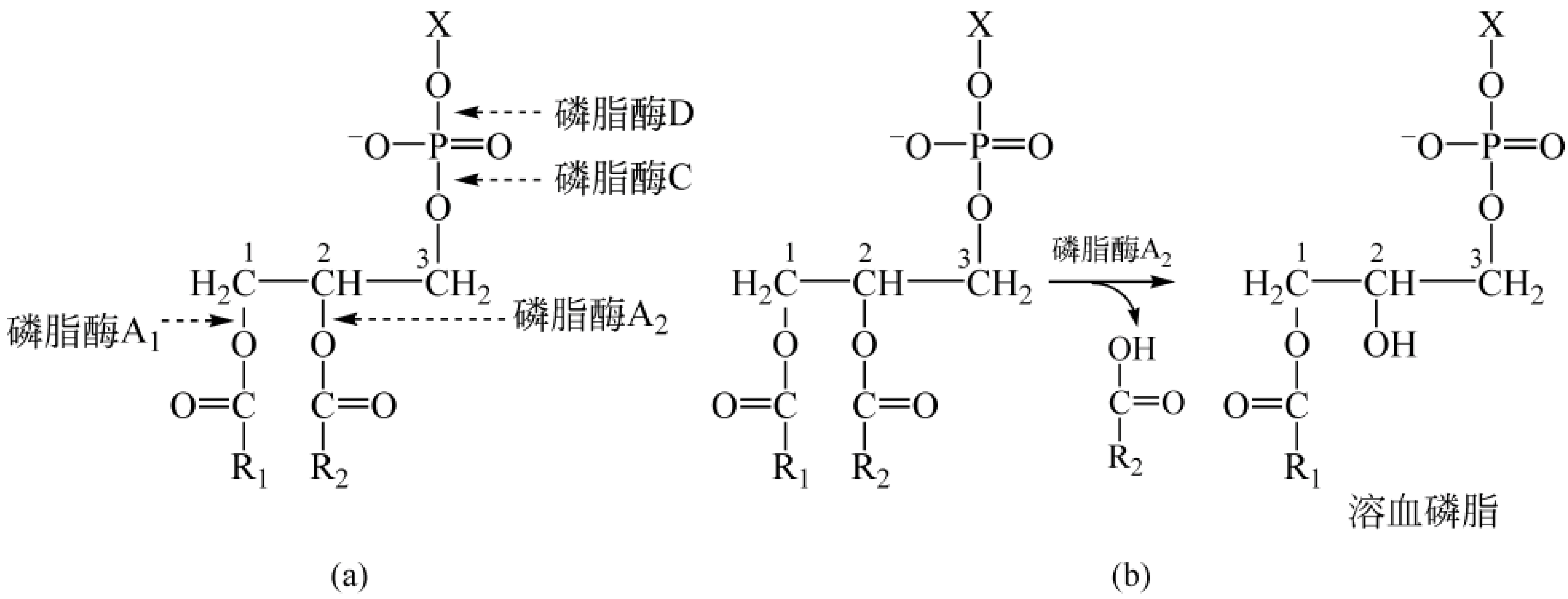


图 7.7　4 种磷脂酶作用的部位

(a) 4 种磷脂酶作用于甘油磷脂的位置;(b) 磷脂酶 A_2 催化甘油磷脂生成溶血磷脂和脂肪酸 X 为其他基团

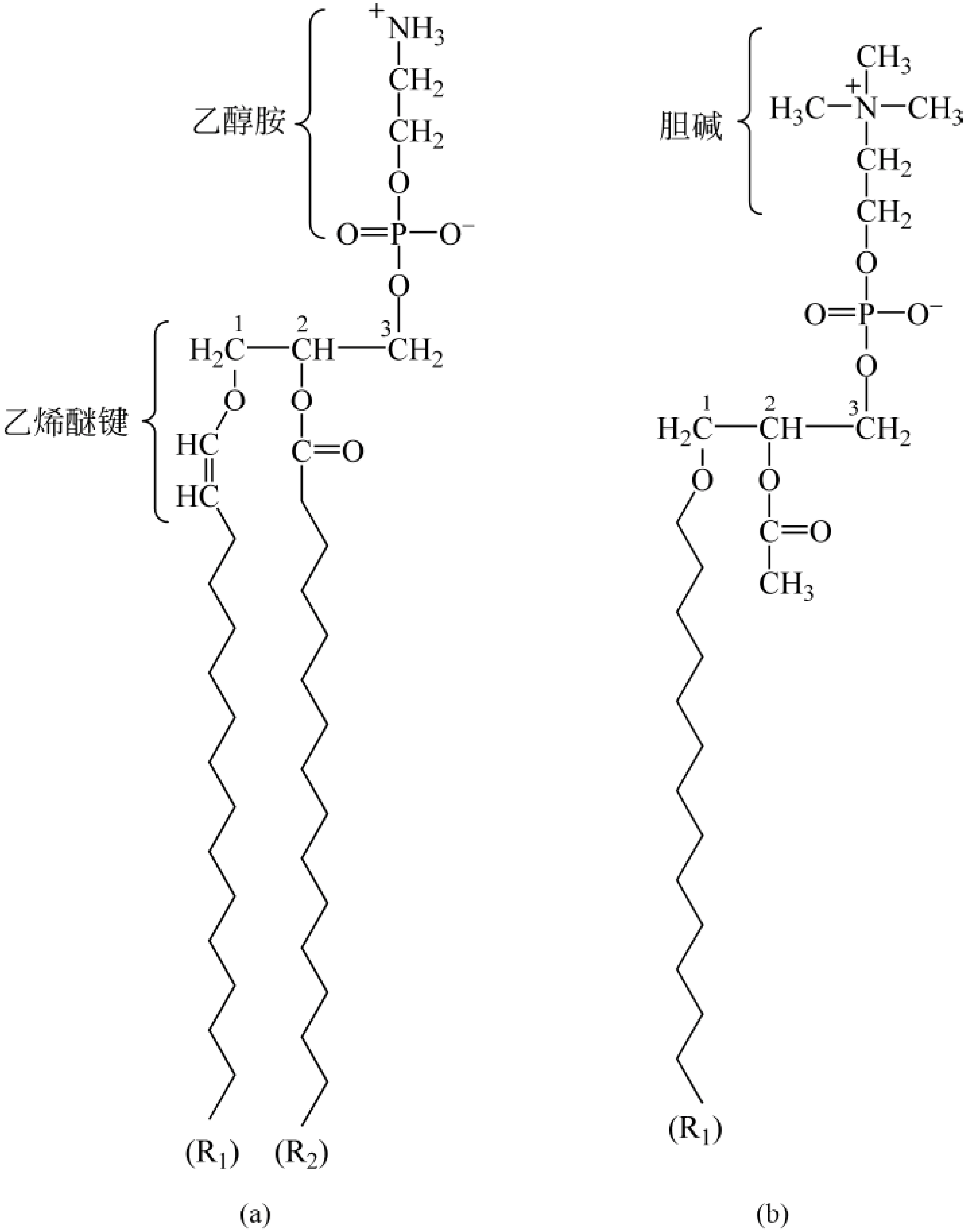


图 7.8　缩醛磷脂

(a) 乙醇胺缩醛磷脂;(b) 血小板激活因子(PAF)

另外,血小板激活因子(platelet activating factor,PAF)也属于甘油磷脂,但结构比较特殊,分子中的甘油骨架 C-1 处连有烷醚基(含有一个醚键),C-2 处连有乙酰基。很低浓度(0.1nmol/L)的 PAF 就可引起血小板凝聚并形成血栓,PAF 对平滑肌的收缩也有作用。

7.4　鞘脂

鞘脂(sphingolipid)是植物和动物细胞膜中第二类最丰富的脂。在哺乳动物中,鞘脂在中枢神经系统中含量特别丰富。鞘脂的结构骨架是鞘氨醇(sphingosine),是一个十八碳的氨基醇。C-4 和 C-5 之间存在一反式双键,C-2 处有一氨基(图 7.9)。如果鞘氨醇的 C-2 氨基通过酰胺键结合一个脂肪酸,就形成神经酰胺(ceramide),神经酰胺是所有鞘脂合成的前体。鞘脂主要包括鞘磷脂(sphingomyelin)、脑苷脂(cerebroside)和神经节苷脂(ganglioside)。

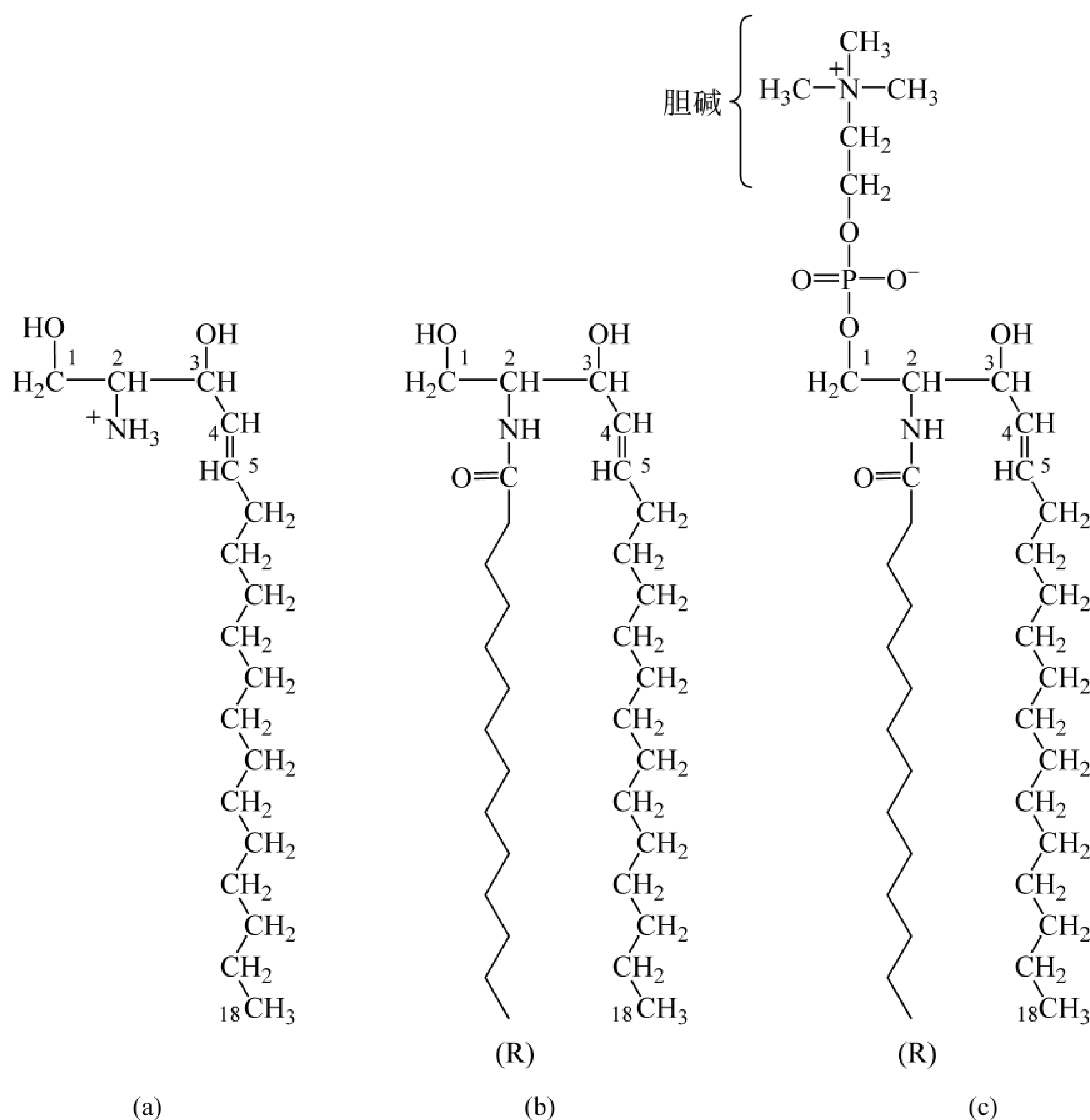


图 7.9　鞘磷脂

(a) 鞘氨醇(反-4-鞘氨醇),在 C-2 位连接一个氨基;(b) 神经酰胺,在鞘氨醇的氨基上连接了一个长链脂酰基;(c) 胆碱鞘磷脂,在神经酰胺的 C-1 上连接了一个磷酸基,磷酸基上再连接了一个胆碱

1. 鞘磷脂

鞘磷脂由神经酰胺连接一个磷酰胆碱或磷酸乙醇胺构成,是个含有极性头部胆碱磷酸或乙醇胺磷酸和两个长的疏水尾巴的两性分子,例如图 7.9(c)给出的胆碱鞘磷脂。

鞘磷脂存在于大多数哺乳动物细胞的质膜内,是包围着某些神经细胞髓鞘的主要成分,也可归类于神经鞘磷脂。

2. 脑苷脂

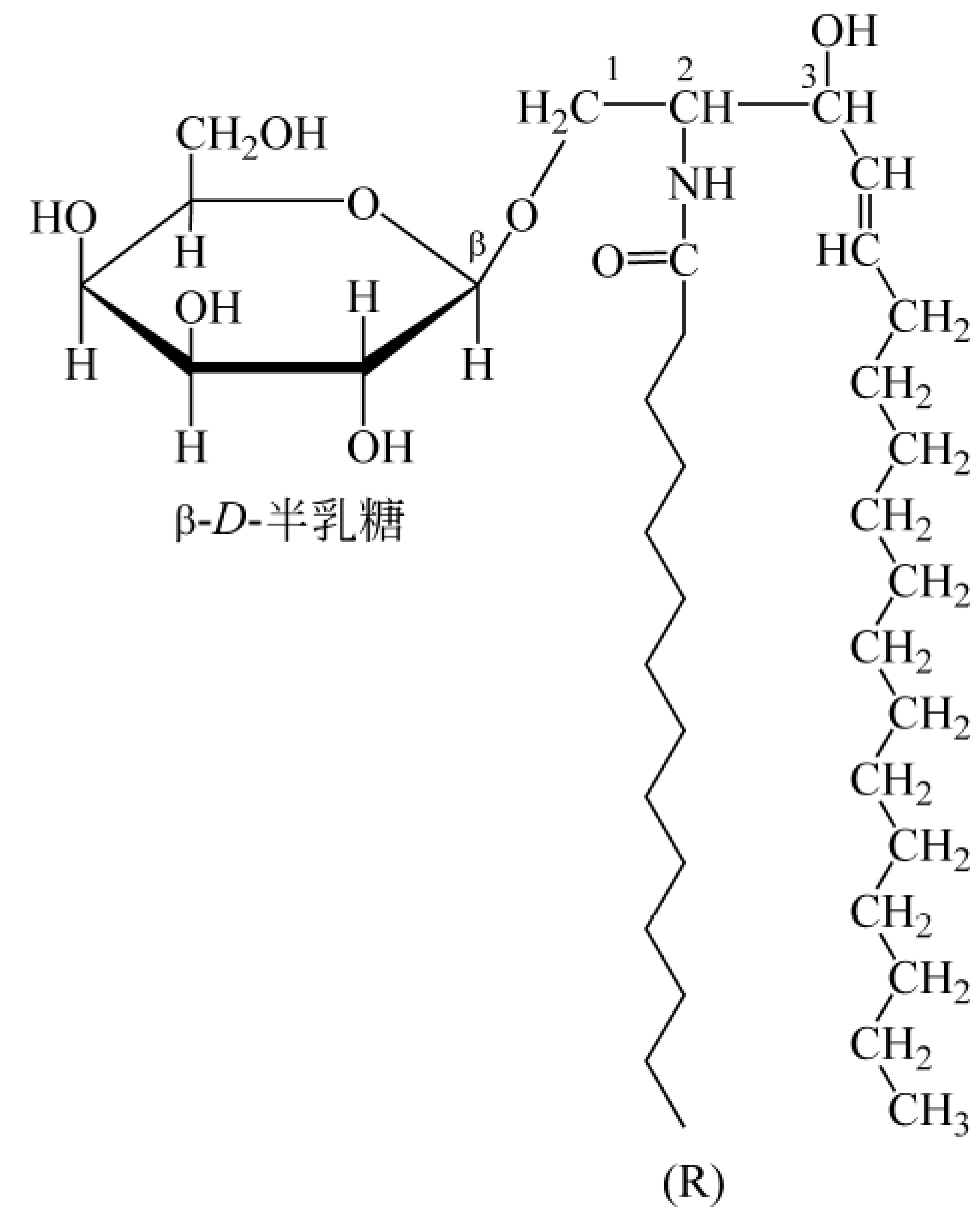


图 7.10　半乳糖脑苷脂

β-D-半乳糖连接在神经酰胺 C-1 的羟基上

脑苷脂是含有一个单糖残基的鞘糖脂，单糖通过β-糖苷键与神经酰胺连接。半乳糖脑苷脂也称为半乳糖神经酰胺，极性头部为β-D-半乳糖残基(图 7.10)。半乳糖脑苷脂在神经组织中很丰富，约占髓鞘中脂的15%，有些组织还含有葡糖脑苷脂。

3. 神经节苷脂

神经节苷脂是最复杂的鞘糖脂，乙酰化的N-乙酰神经氨酸(唾液酸)的寡糖链连接在神经酰胺上。据报道已知的神经节苷脂有60多种，图 7.11 给出了其中 G_{M1}、G_{M2} 和 G_{M3} 的结构。神经节苷脂位于细胞膜表面，其寡糖链头部伸出膜表面，不仅可以特异地接收来自垂体糖蛋白激素的信号，触发细胞内很多重要生理功能，而且在细胞识别中还起着重要作用。

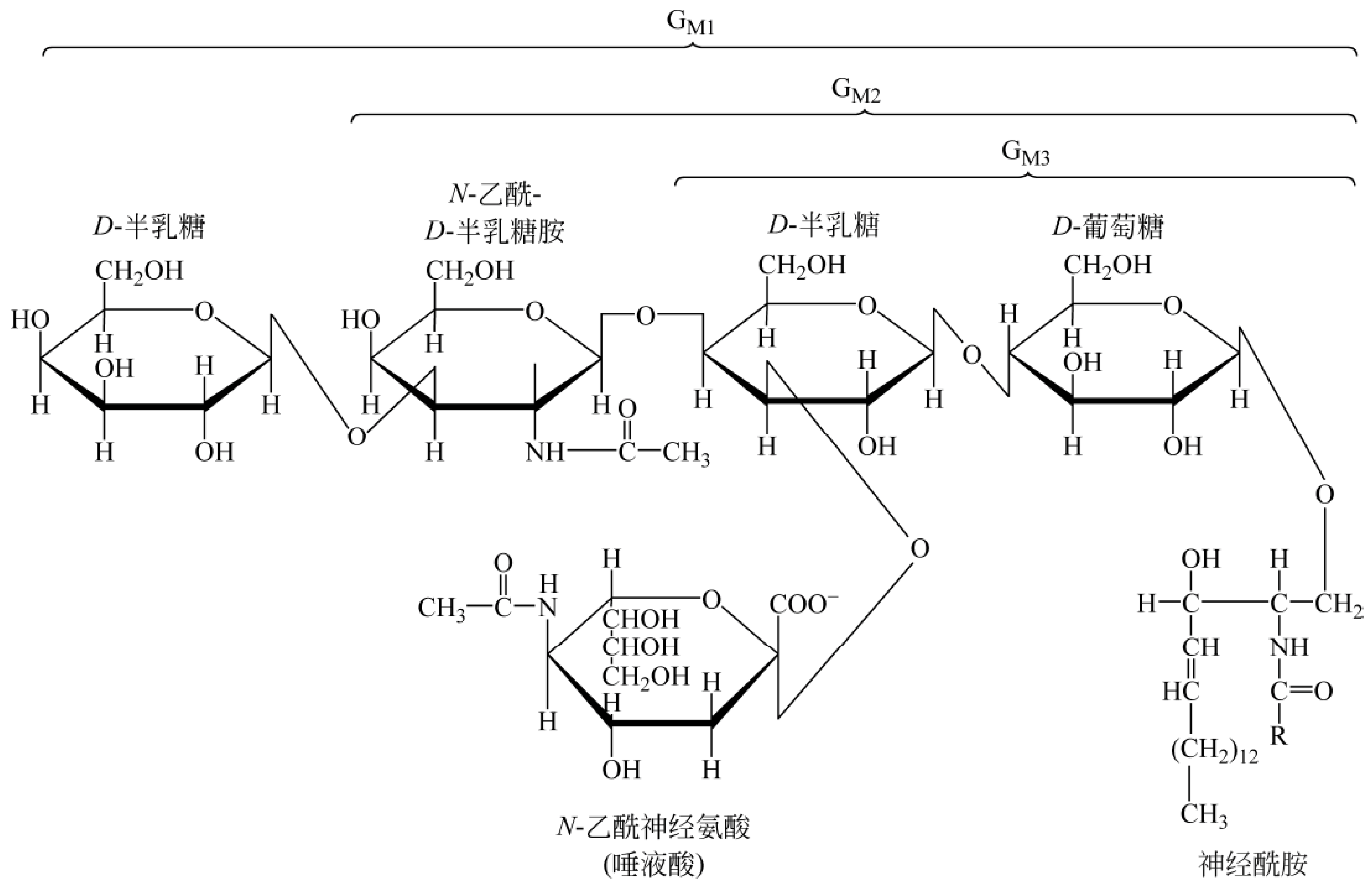


图 7.11　神经节苷脂 G_{M1}、G_{M2} 和 G_{M3} 结构

7.5　类固醇

类固醇(steroid)是真核生物中发现的第3类常见的膜脂。类固醇与脂溶性维生素和萜(terpenes)由于它们的结构都与异戊二烯有关,因此都归类于类异戊二烯。图7.12给出了几种类固醇结构。类固醇含有4个稠环:A、B和C 3个六碳环,一个五碳D环,这些环结构都是由鲨烯衍生而来。

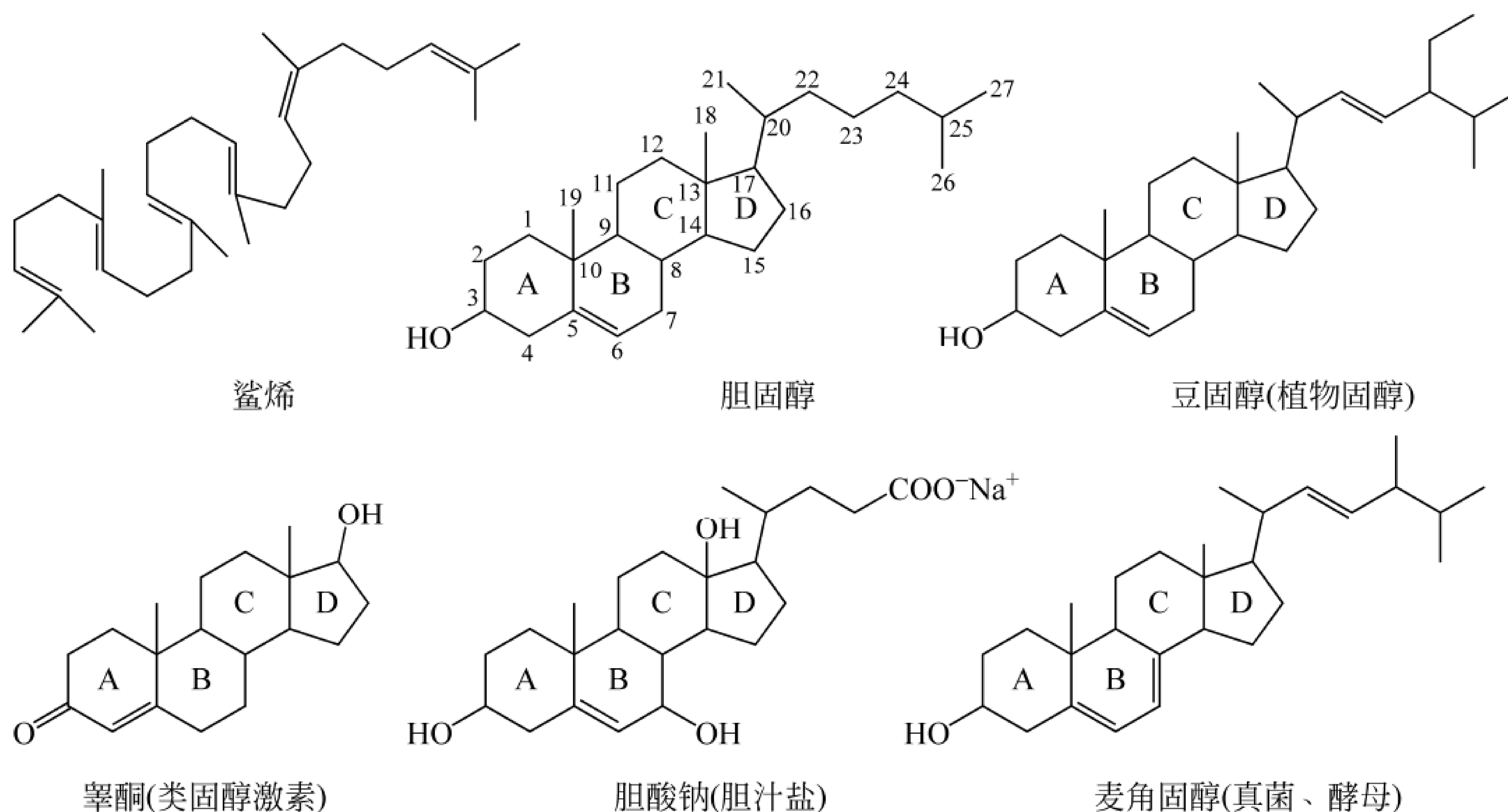


图7.12　几种类固醇结构

类固醇疏水性要比甘油磷脂和鞘脂高得多,游离的胆固醇在水中的最大浓度只有10^{-8} mol/L。胆固醇C-3的羟基与一个脂肪酸酯化可形成胆固醇酯,这个酯的疏水性比胆固醇更强,因为它的3-酰基是非极性的(图7.13)。胆固醇转化为胆固醇酯为的是储存或通过血液转运。

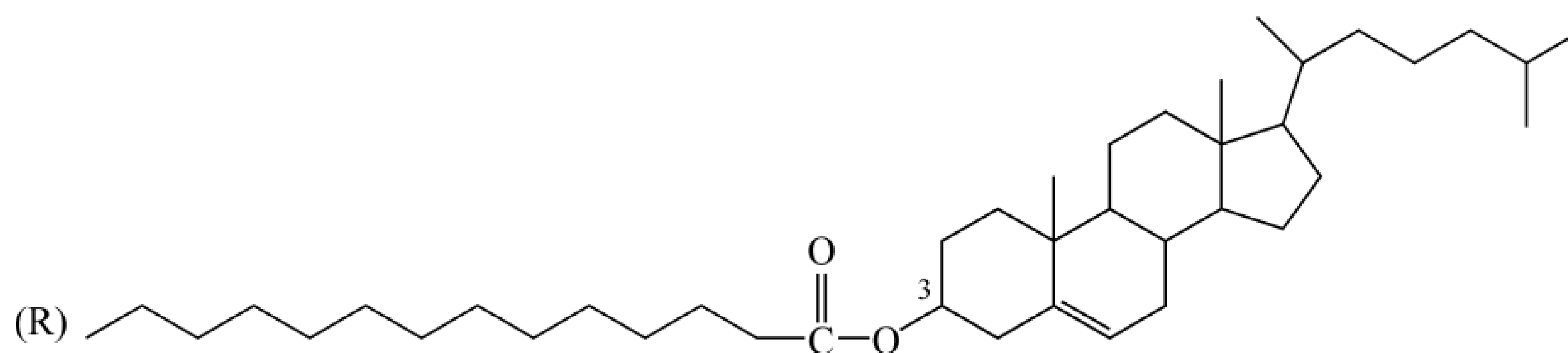


图7.13　胆固醇酯

7.6　其他重要的脂类

除了上面讨论的膜脂以外,还有一些生物学上重要的非膜脂,例如蜡(waxes)、类花生酸(eicosanoid)、一些类异戊二烯(isoprenoids)以及前面描述过的脂溶性维生素,这些非膜

脂的结构和功能各异。

1. 蜡

蜡是长链单羟基醇和长链脂肪酸形成的非极性酯，例如蜂蜡的主要成分棕榈酸蜂花酯(myricyl palmitate)就是十六碳棕榈酸与蜂花醇(三十烷醇)形成的酯(图7.14)。

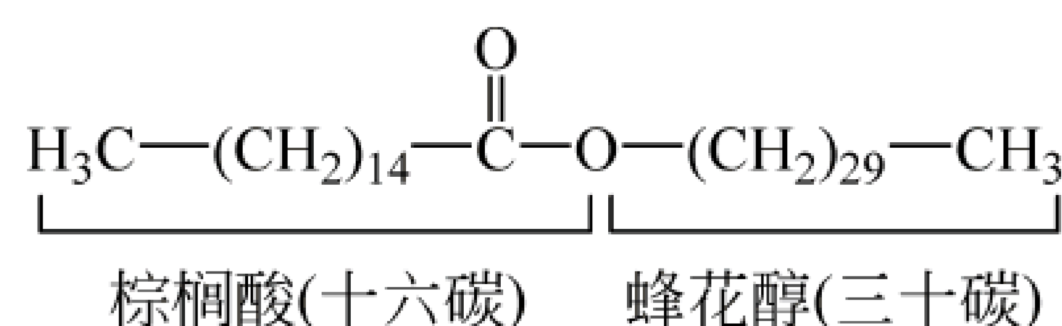


图7.14　棕榈酸蜂花酯

由于棕榈酸蜂花酯高度疏水性，使得蜂蜡极难溶于水。而且因它带有长链的烃链导致高熔点，使得蜂蜡在通常的野外温度下变硬和呈固体状态。蜡广泛分布于自然界中，它们为植物的叶子和果实及动物的皮肤、羽毛和外骨骼提供了一个保护的防水包被层。另外，外耳道内皮脂腺分泌的黄色耳垢也是一种蜡状物质，称为耳蜡(earwax)。

2. 类花生酸

类花生酸包括前列腺素(prostaglandin)、前列环素(prostacyclin)、血栓烷(thromboxane)和白三烯(leucotriene)等都是花生四烯酸的氧合衍生物(图7.15)。

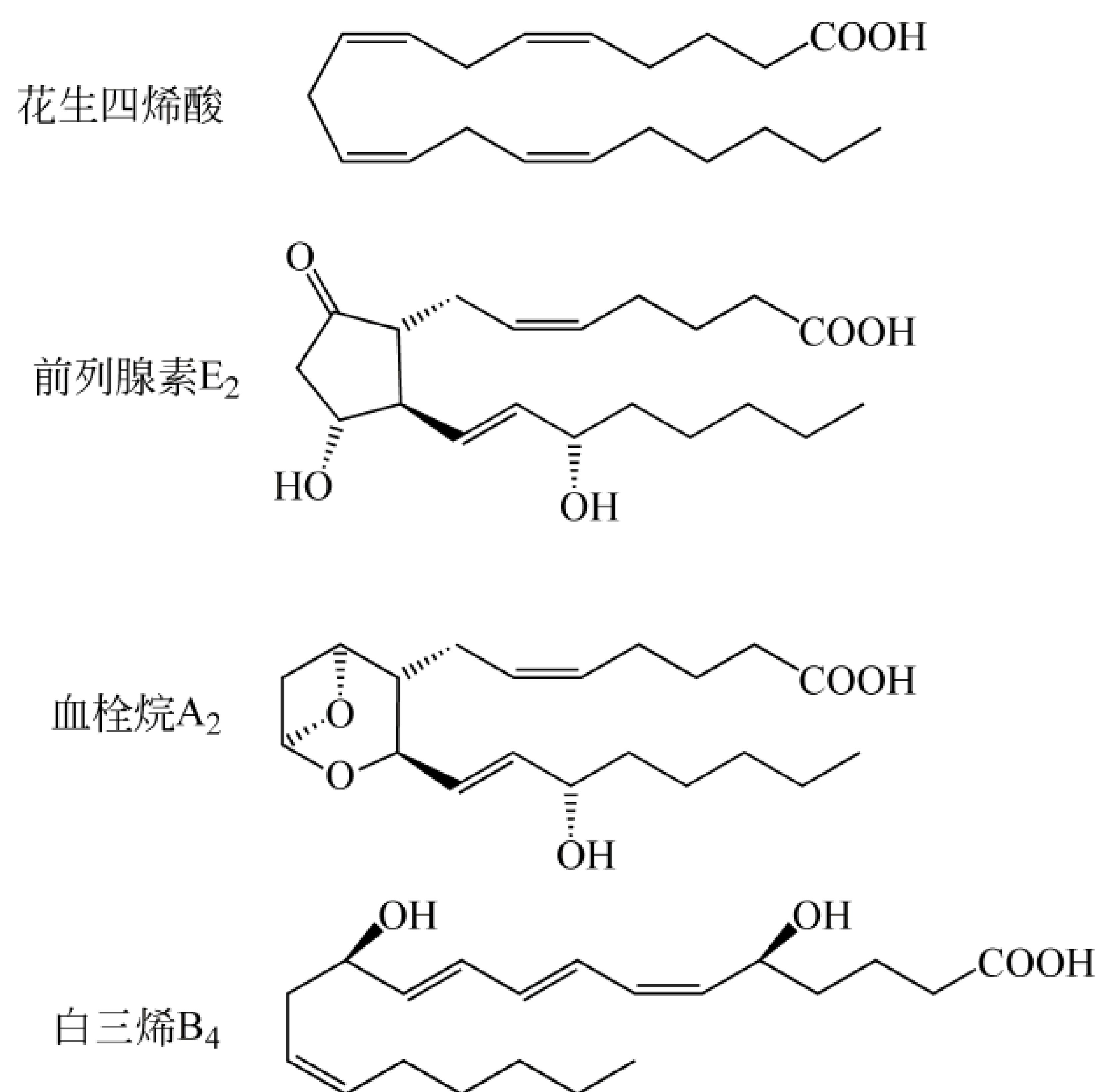


图7.15　花生四烯酸和3种类花生酸结构

图中每种类花生酸只给出一个例子，实际上每种都存在很多生理上重要的衍生物

类花生酸参与很多生理过程，例如前列腺素 E_2 有引起血管收缩、诱发炎症以及明显抑制胃液分泌的作用。由血小板产生的血栓烷 A_2 会引起血小板凝集，形成血栓，可能导致心脏病和心肌梗死。与血栓烷 A_2 的作用相反，由血管内膜产生的前列环素却能够抑制血小板凝集，并有舒张血管的作用。白三烯 B_4 可引起平滑肌收缩，支气管狭窄，导致哮喘。

类花生酸与循环激素不同，它们不是通过血液运送到靶组织，而是在局部组织产生和释放，并在组织附近起作用。它们的浓度都很低，一般在数秒钟或数分钟内就被降解了。

阿司匹林(Aspirin),又称乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid)是众所周知的抗感染药,通过抑制合成前列腺素的反应,起到解热、镇痛、消炎和防止过度血凝的作用。

7.7 生物膜

以上描述的脂类中甘油磷脂、鞘磷脂等磷脂与其他脂类不同,是具有极性头部和疏水尾部的两性分子,它们是构成细胞膜的主要成分。本节主要讨论生物膜的结构及其特性。

7.7.1 脂双层

在实验室,将由大豆中提取的卵磷脂放到水中,经超声后可形成疏水尾部暴露于空气,而亲水头部与水面结合的单层膜,疏水尾巴聚集在内部,而头部与水结合的微团,以及内部包裹水的由脂双层构成的称为脂质体(liposome)的自我封闭的双层微囊(图 7.16)。

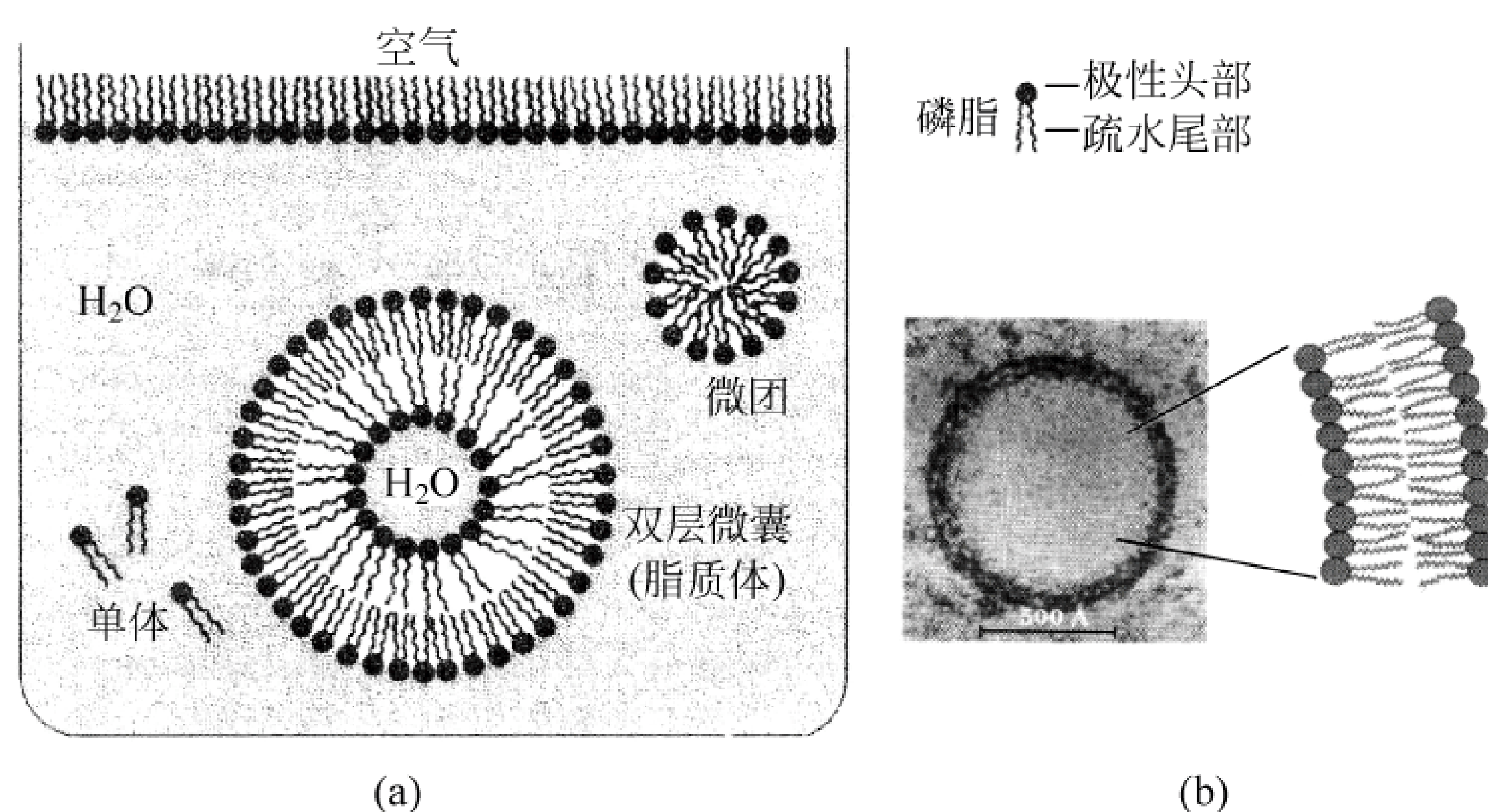


图 7.16 脂双层和脂质体

(a) 卵磷脂经在水中超声形成单层膜、微团和脂双层构成的脂质体等各种形态;
(b) 脂质体的电镜照片(来源:Walther 1974)

在细胞条件下,像甘油磷脂和鞘磷脂那样的两性分子并不能形成完整的微团,而是更容易形成脂双层。脂双层是包括质膜和真核细胞内膜在内的所有生物膜的主要成分。脂双层中脂分子之间的非共价相互作用使得膜具有柔性并自我密封。三酰甘油是个高疏水性分子,而不是两性分子,所以不能形成脂双层。虽说胆固醇稍显两性,只靠它本身也不能形成脂双层,但一些真核细胞膜中含有胆固醇。

一个典型脂双层的厚度为 5～6nm,由两个片层或两个单层(也称小叶)构成。每个片层中的两性脂的极性头部与水相介质接触,而非极性(疏水)的烃链尾部朝向双层的内部。约占整个膜脂 30%的胆固醇和其他脂可排列在其余 70%磷脂组成的脂双层中。生物膜的另一个必要成分是蛋白质,蛋白质镶嵌在膜中或与膜表面结合。一个含蛋白质的典型生物膜的厚度是 6～10nm。膜蛋白直接参与跨膜的分子转运、信号转导以及质膜和细胞骨架之间的相互作用。

1972 年 S. Jonathan Singer 和 Garth L. Nicolson 就生物膜的结构提出了流动镶嵌模型(fluid mosaic model)[图 7.17(a)]。根据这一模型的描述,磷脂构成脂双层,膜蛋白或横

跨,或镶嵌在脂双层中,或附着在脂双层表面。图7.17(b)显示的是当前具有代表性的细胞质膜模型,可以看出组织结构与流动镶嵌模型基本相同。

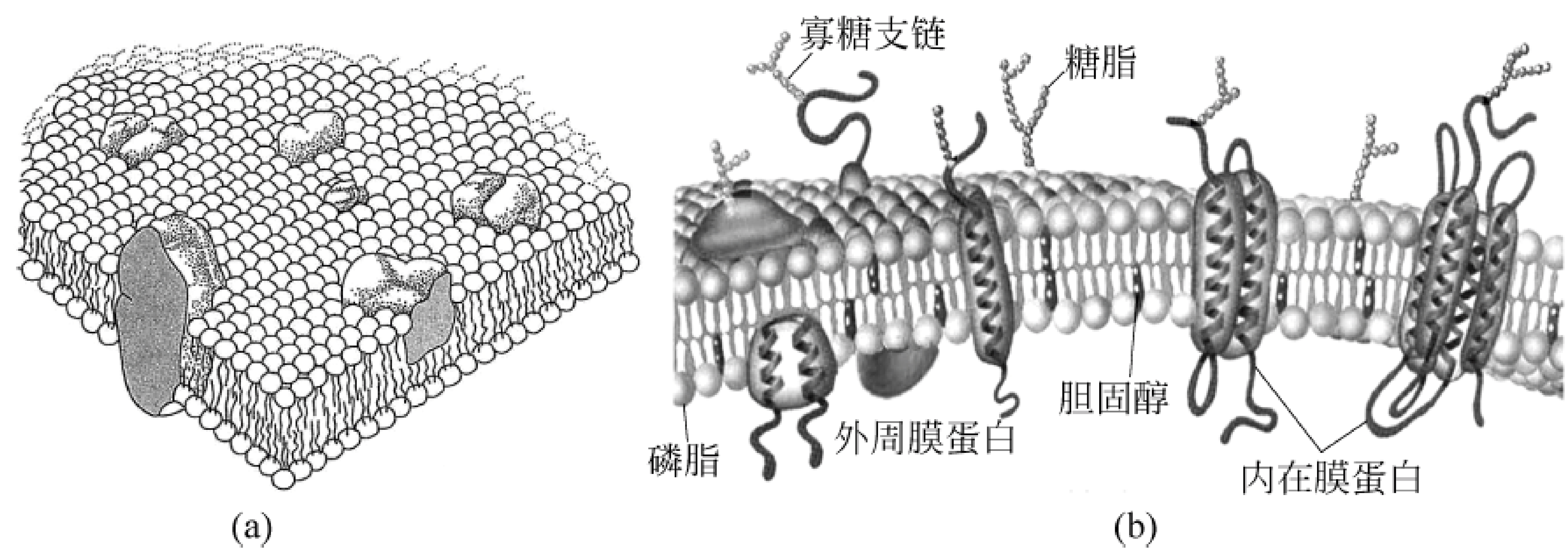


图7.17 生物膜结构

(a) Singer 和 Nicolson 提出的流动镶嵌模型;(b) 典型的真核细胞质膜结构示意图

7.7.2 膜蛋白

从图7.17(b)看到,生物膜主要是由膜蛋白和脂双层构成,此外膜中还插入了一些胆固醇。根据膜蛋白与脂双层结合的方式,又可将膜蛋白分为内在膜蛋白(integral membrane protein)、外周膜蛋白(peripheral membrane protein)和脂锚定膜蛋白(lipid-anchored membrane protein)[又称脂联膜蛋白(lipid-linked membrane protein)]。

1. 内在膜蛋白

内在膜蛋白也称为内嵌膜蛋白,插入或跨越脂双层,含有嵌入脂双层疏水部位的疏水区。很多内在跨膜蛋白都含有一个或多个跨膜α-螺旋肽段,例如血型糖蛋白A含有一个由19个疏水氨基酸残基组成的跨膜α-螺旋,而细菌视紫红质(bacteriorhodopsin)含有7个跨膜的α-螺旋肽段,每个肽段约含有25个氨基酸残基(图7.18)。视紫红质位于嗜盐细菌的质膜中,是一个光驱动的质子泵,利用光能产生一个跨膜的质子浓度梯度,提供驱动ATP合成的能量。

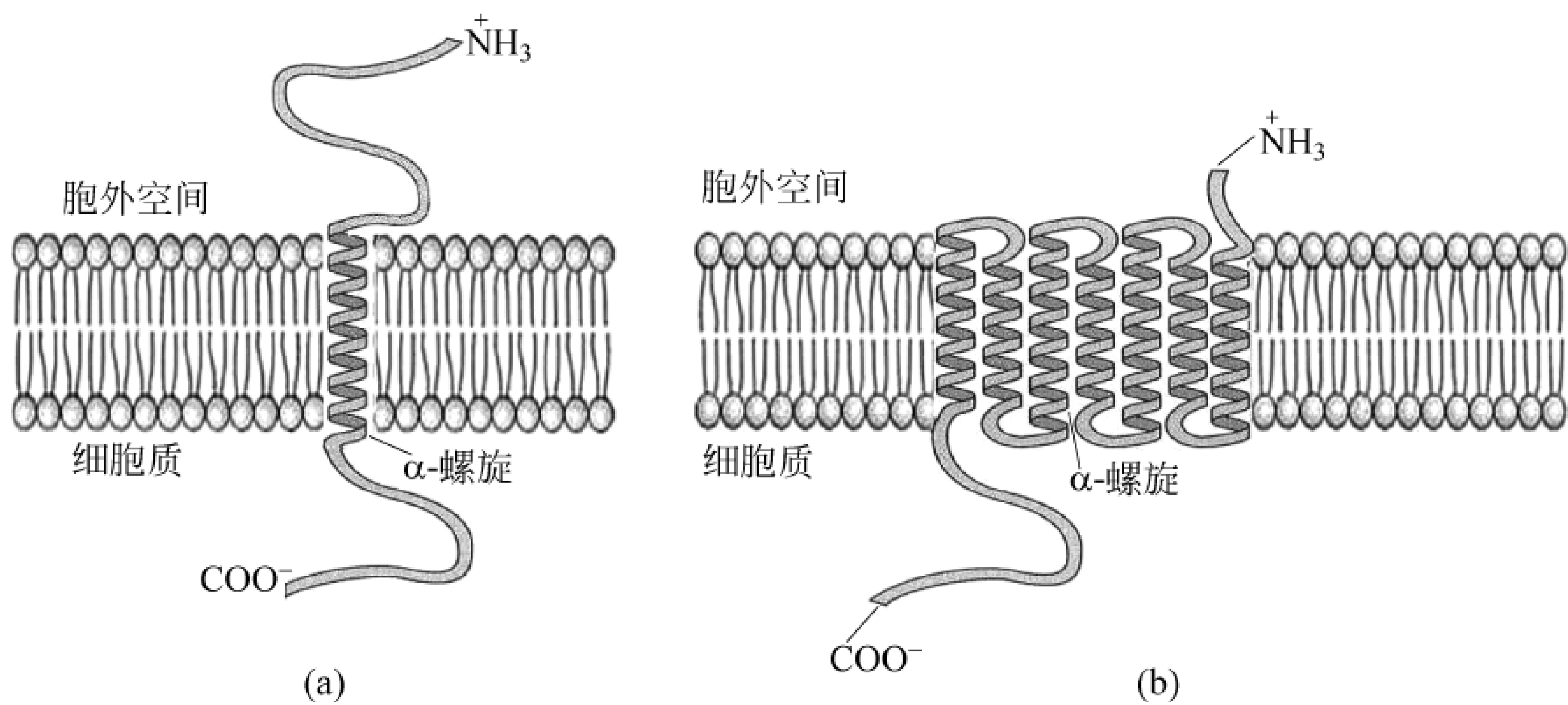


图7.18 含跨膜肽段的内在膜蛋白

(a) 含一个跨膜α-螺旋的人红细胞血型糖蛋白A;(b) 含7个跨膜α-螺旋的细菌视紫红质

2. 外周膜蛋白

外周膜蛋白与内在膜蛋白不同,它只与膜一面接触,而且与膜的作用弱得多,通常都是通过离子键和氢键与膜脂的极性头部或与内在膜蛋白伸出膜表面的部位结合。通过改变pH或离子强度,外周膜蛋白很容易从膜上分离出来。

3. 脂锚定膜蛋白

有些膜蛋白含有共价连接的脂,通过脂锚定在膜上。图7.19给出了3种类型脂锚定膜蛋白。蛋白质a是糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白[glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchored protein],蛋白部分与磷酸乙醇胺连接,磷酸乙醇胺再与一个聚糖相连。聚糖组成不固定,通常与磷酸乙醇胺相连的是甘露糖(Man)残基,而与肌醇(Ins)磷酸相连的是葡糖胺(GlcN)残基。磷脂酰肌醇中的二酰甘油部分将蛋白锚定在膜上。

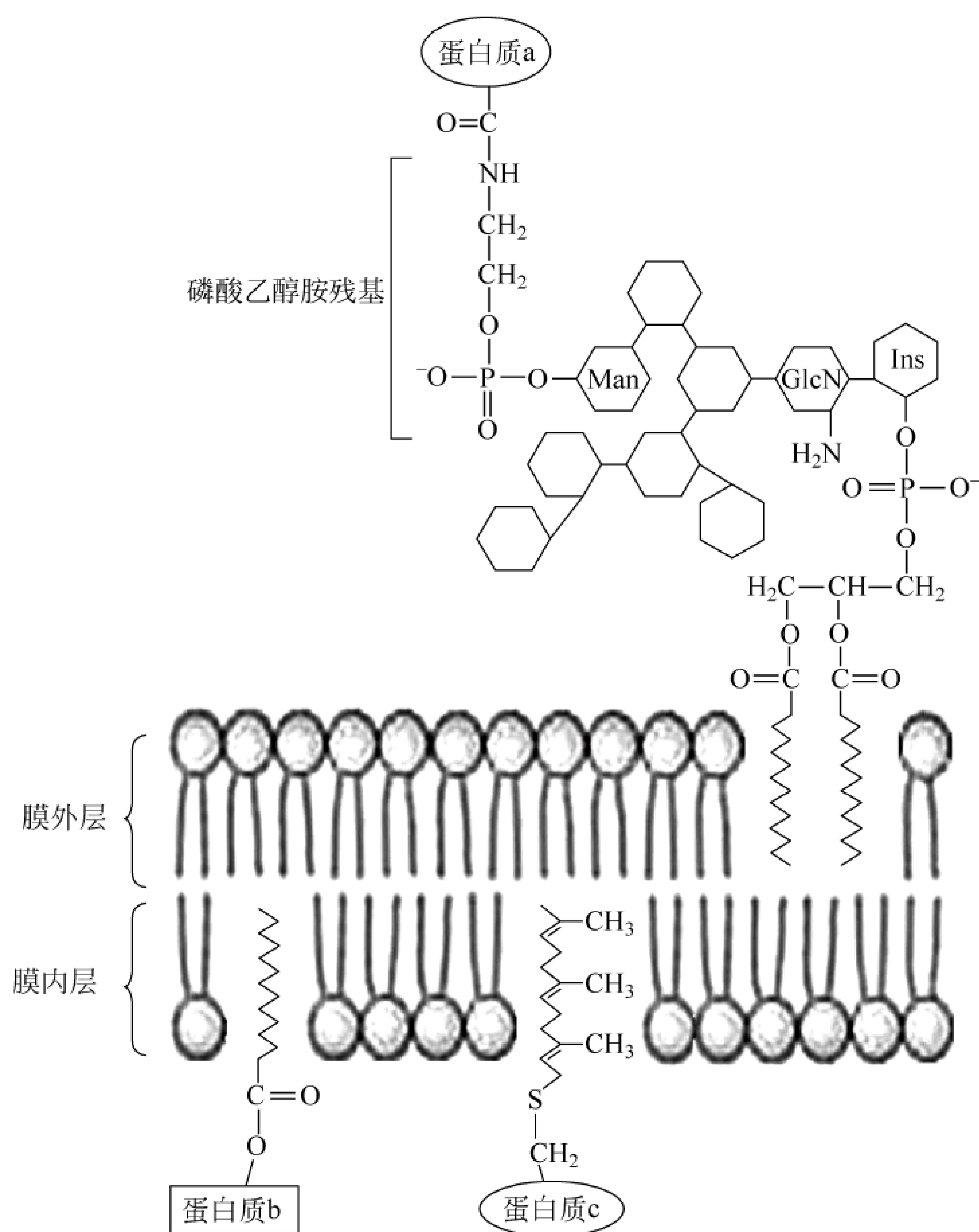


图7.19　3种类型脂锚定膜蛋白

蛋白质a:糖基磷脂酰肌醇锚定膜蛋白;蛋白质b:脂酰锚定膜蛋白;蛋白质c:异戊烯锚定膜蛋白

蛋白质b称为脂酰锚定膜蛋白,脂肪酸插入膜中,将蛋白锚定在膜上。蛋白质c称为异戊烯锚定膜蛋白,通过位于或靠近C末端的半胱氨酸残基的S原子与插入到膜中的类异戊二烯法尼基共价连接锚定在膜上。

7.8 膜的流动性

膜的流动性是流动镶嵌模型的特征之一,已经得到了很多实验的证明和支持。膜的流动性指的是生物膜内分子的运动性,包括膜脂和膜蛋白在膜内的运动。

7.8.1 膜脂的侧向运动

实验证实膜中的同一层脂类分子很容易与邻近的分子交换位置,这样的运动称为侧向运动或侧向扩散(图7.20)。膜脂的侧向运动速度非常快,在一个约2μm长的细菌细胞中,一个磷脂分子在37℃下从一端扩散到另一端约只需1秒。

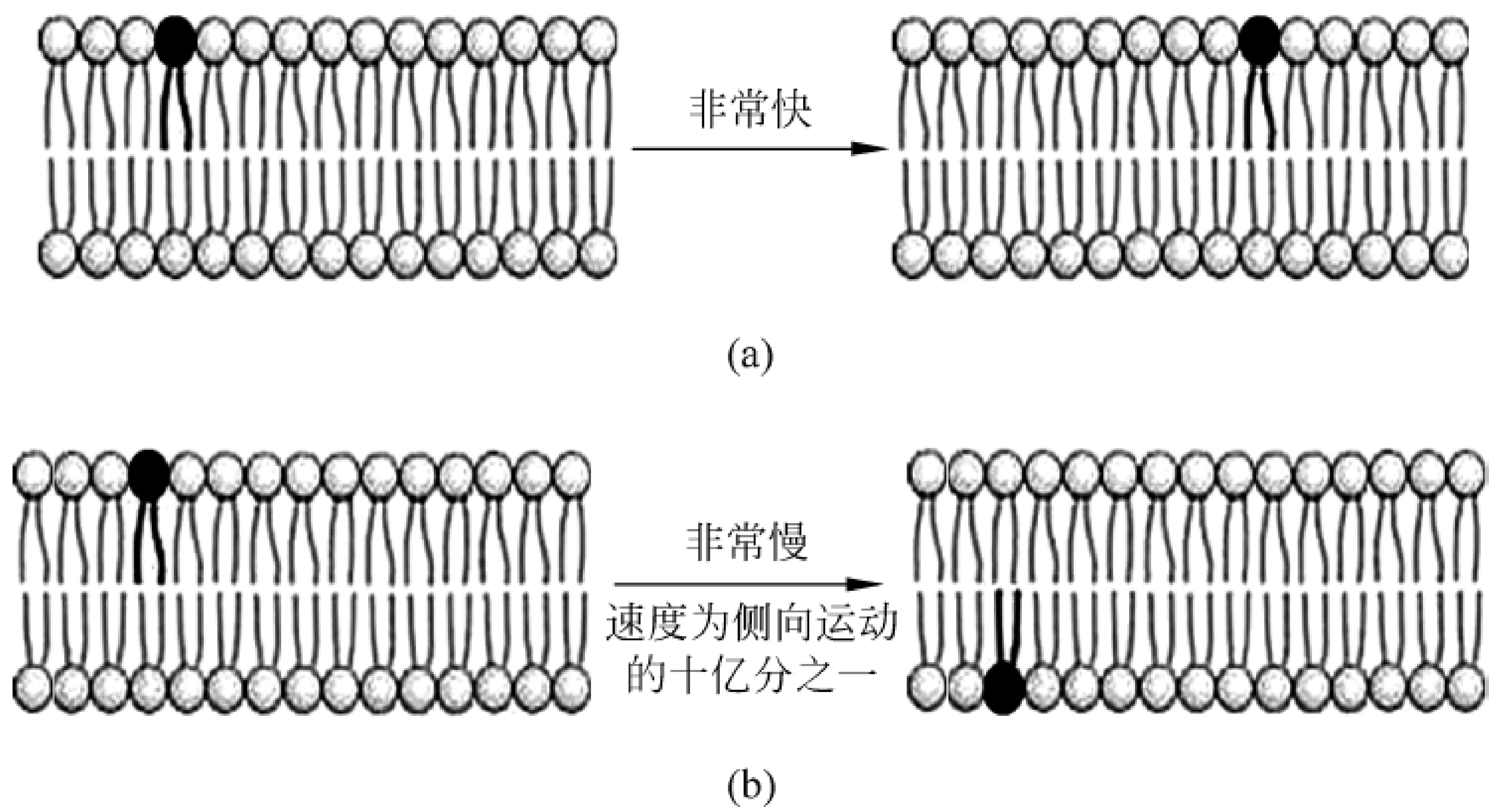


图7.20 膜脂在脂双层膜中的扩散

(a) 侧向扩散;(b) 横向扩散

与侧向运动相反,横向运动(也称为翻转),即脂双层中的某一层内的脂自然过渡到另一层是非常慢的,速度约为同一层内的任何两个脂交换的$1/10^9$,因为实现这一过程需要很大的激活能。但哺乳动物细胞中含有的一种翻转酶(flippases)或转运酶(translocase)能够快速地将特定的磷脂从脂双层的一层转移到另一层。

脂双层膜的流动性受温度影响,在低温时脂双层膜处于一种有序的凝胶相,但当被加热,超过称为转换温度(transition temperature, T_m)的某一特定温度时,发生了类似于晶体熔解的相转变,形成液晶相(图7.21)。处于液晶相时,膜表面积增加,厚度减少,而膜中脂的疏水链的流动性将显著增加,当温度低于T_m时,又恢复到凝胶相。大多数生物膜的T_m都处于10~40℃,这与膜脂的烃链长度和饱和度有关。

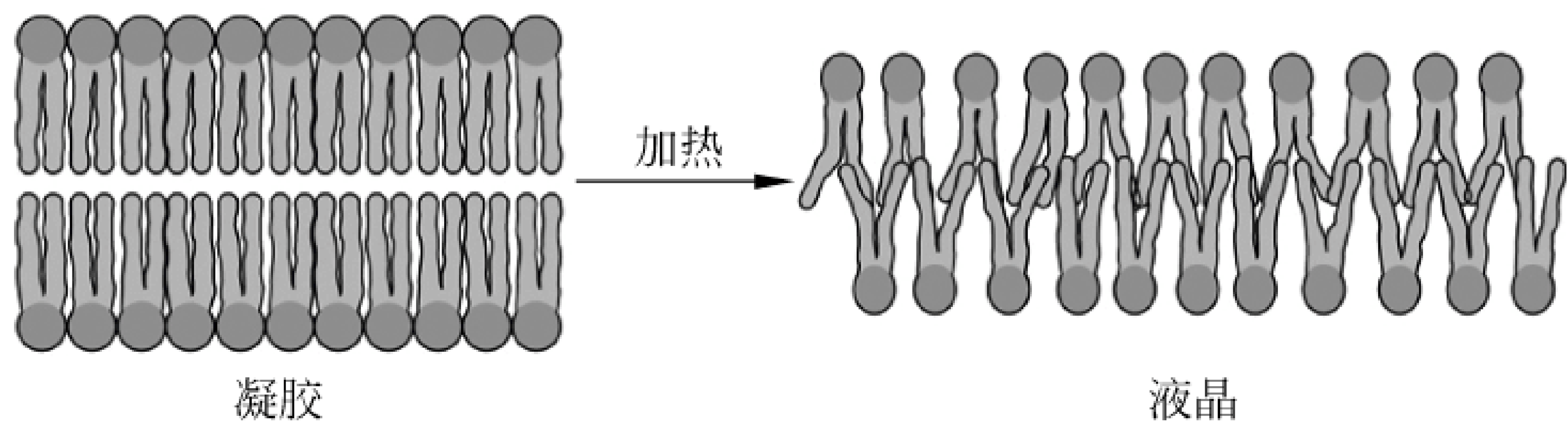


图7.21 凝胶至液晶的相转变

膜的流动性也与膜脂组成和结构有关。例如在单纯磷脂双层膜中插入胆固醇，由于它的刚性环结构嵌入到烃链之间，限制了膜脂的脂肪酸链的运动，导致膜的流动性降低，而且使膜的 T_m 变宽。

7.8.2 膜蛋白的侧向扩散

1970 年 L. D. Frye 和 Michael A 设计了一个用来验证内在膜蛋白可以在脂双层中侧向扩散的实验。他们用红色荧光标记的抗人细胞质膜某个膜蛋白的抗体标记人细胞，而用绿色荧光标记的抗小鼠细胞质膜某个膜蛋白的抗体标记小鼠细胞。然后将两种分别标记的细胞进行融合，通过免疫荧光显微镜观察两种荧光标记的细胞融合后细胞膜上内在膜蛋白的变化。

当两种细胞融合后，开始一半为红色，一半为绿色，约在融合后 40 分钟，就观察到红、绿荧光点混杂，表明两种细胞中标记的膜蛋白混在一起了(图 7.22)。这一实验表明，至少某些膜蛋白可以在生物膜内自由扩散。

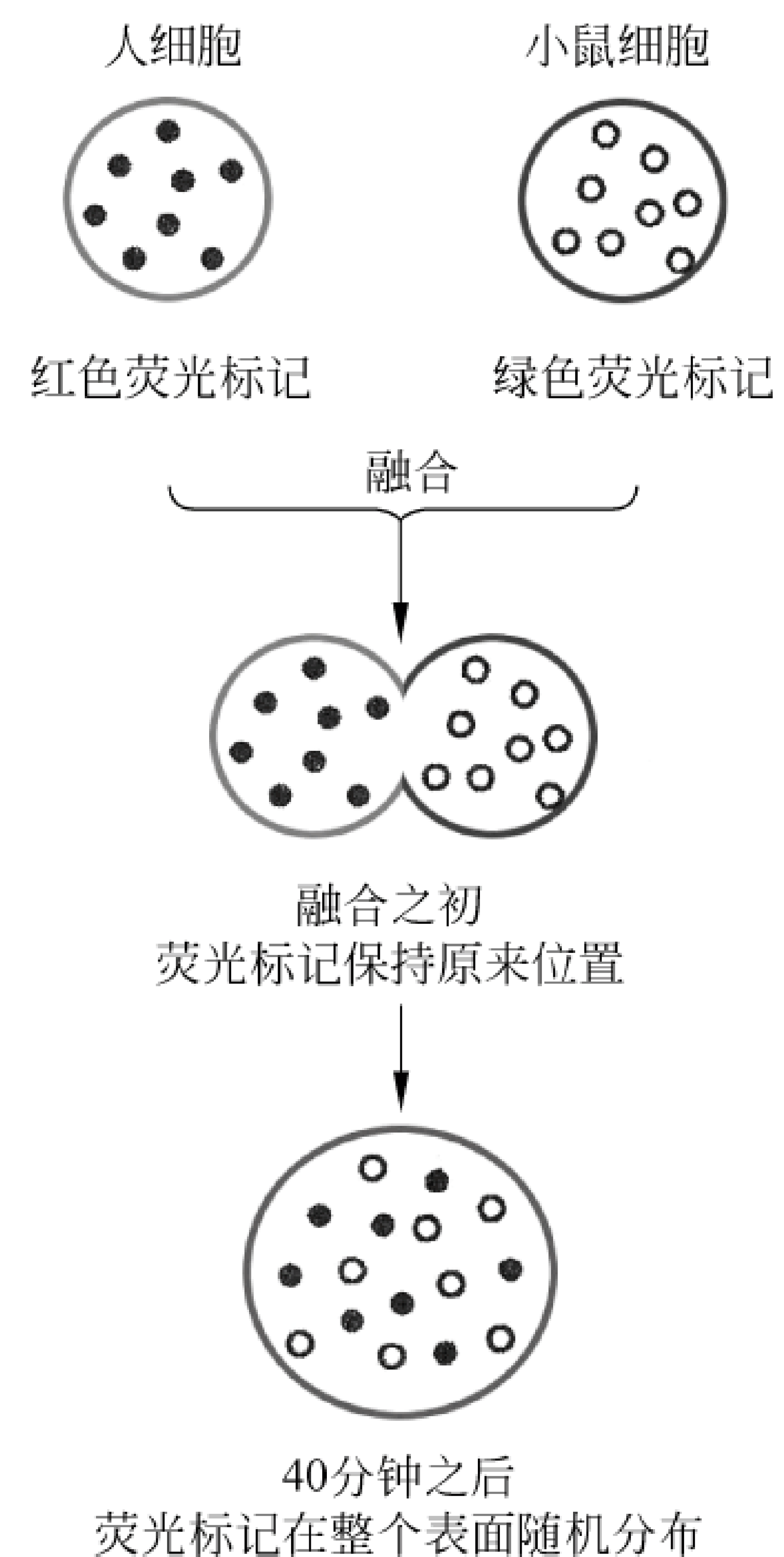


图 7.22 膜蛋白的侧向扩散

膜蛋白在膜中的扩散也可通过光漂白荧光恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching，FRAP)观察到，首先用荧光染料标记培养细胞的内在膜蛋白，或是用荧光标记的抗特定膜蛋白的抗体标记膜蛋白。将标记的细胞在显微镜下用强荧光脉冲束照射被固定的细胞的某一部分，处于这部分的荧光分子会发生不可逆的漂白，结果在该照射部分留下了一个漂白的空斑[图 7.23(a)]。

就像由图 7.23(b)所看到的那样，漂白区中荧光又慢慢地恢复了，惟一的解释是被漂白的荧光标记膜蛋白分子扩散出漂白区，而周围未受激光照射的荧光标记分子扩散进入漂白区，使得漂白区荧光恢复。很显然，荧光恢复速率依赖于荧光标记的膜蛋白的扩散速率。实验证明膜蛋白能够侧向运动，实验也提供了一个直接测量膜蛋白的扩散速率的方法。

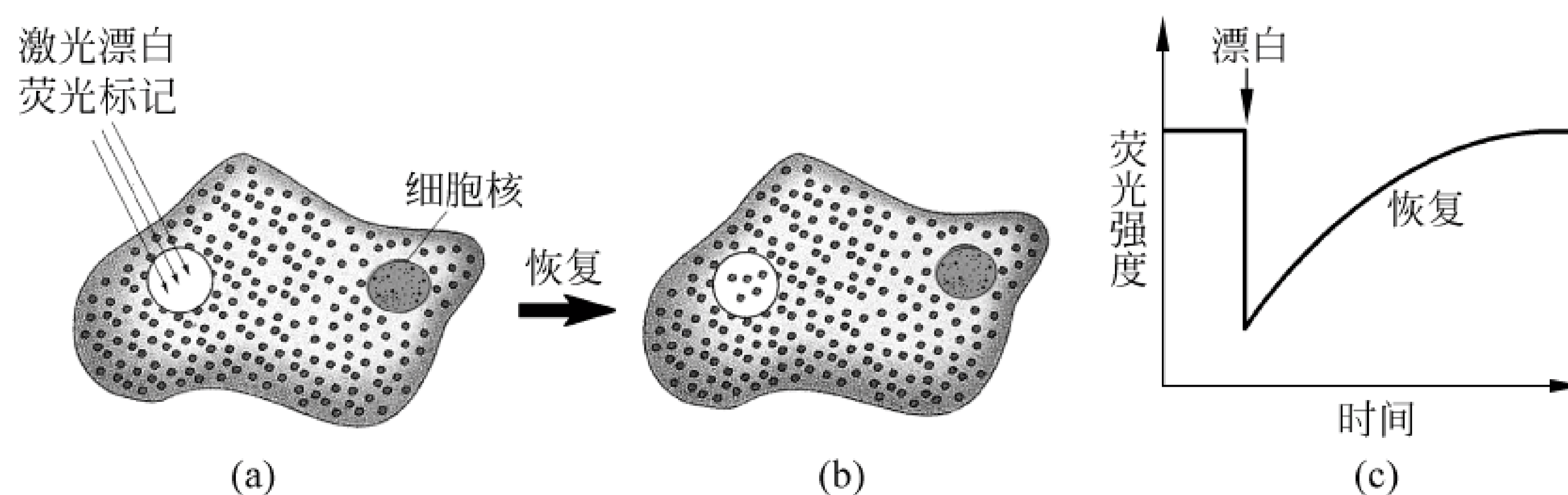


图 7.23 光漂白荧光恢复技术测量膜蛋白扩散速率

(a) 强激光漂白荧光染料标记的固定细胞的一个区域；(b) 被漂白分子扩散出漂白区，而周围未受激光照射的荧光分子扩散进入漂白区，漂白区荧光恢复；(c) 荧光恢复速率取决于荧光标记膜蛋白的扩散速率

7.9 跨膜转运

每个细胞为了正常地进行新陈代谢,都要从细胞外吸收必需的原材料和营养物质,同时将细胞内的产物(例如激素、某些蛋白质和酶等)以及一些废物(例如二氧化碳和尿素等)释放到环境中。然而,细胞质膜是细胞与外界的屏障,虽然一些疏水的、小的非极性分子可以自由地扩散通过细胞膜,但对大多数带电的和极性的分子来说,脂双层是几乎不可逾越的壁垒,所以这些物质进出质膜必须要通过膜的转运系统来完成。

根据跨膜转运物质是否消耗能量,转运系统分为不需要能量的被动转运(passive transport)和需要能量支持的主动转运(active transport)。

7.9.1 被动转运

在被动转运中,物质由高浓度区移动到低浓度区,换言之,物质都是顺着浓度梯度移动,细胞不需要消耗能量。被动转运过程又可分为两类:简单扩散和易化扩散(facilitated diffusion)。在简单扩散中,分子可直接通过膜,而不需要借助其他分子帮忙。小的、不带电荷的分子,例如 O_2、N_2 和 CO_2 都可经简单扩散通过细胞膜,移动速度取决于跨膜的浓度差。

在易化扩散中分子利用载体蛋白转运过膜,比较大的分子(尤其是极性分子)和离子从高浓度移向低浓度都要借助于载体。易化扩散最典型的一个例子就是葡萄糖转运到红细胞内的过程。血液中葡萄糖浓度约为 5mmol/L,而红细胞内浓度低于 5mmol/L,葡萄糖通过葡糖通透酶转运到红细胞内(图 7.24)。

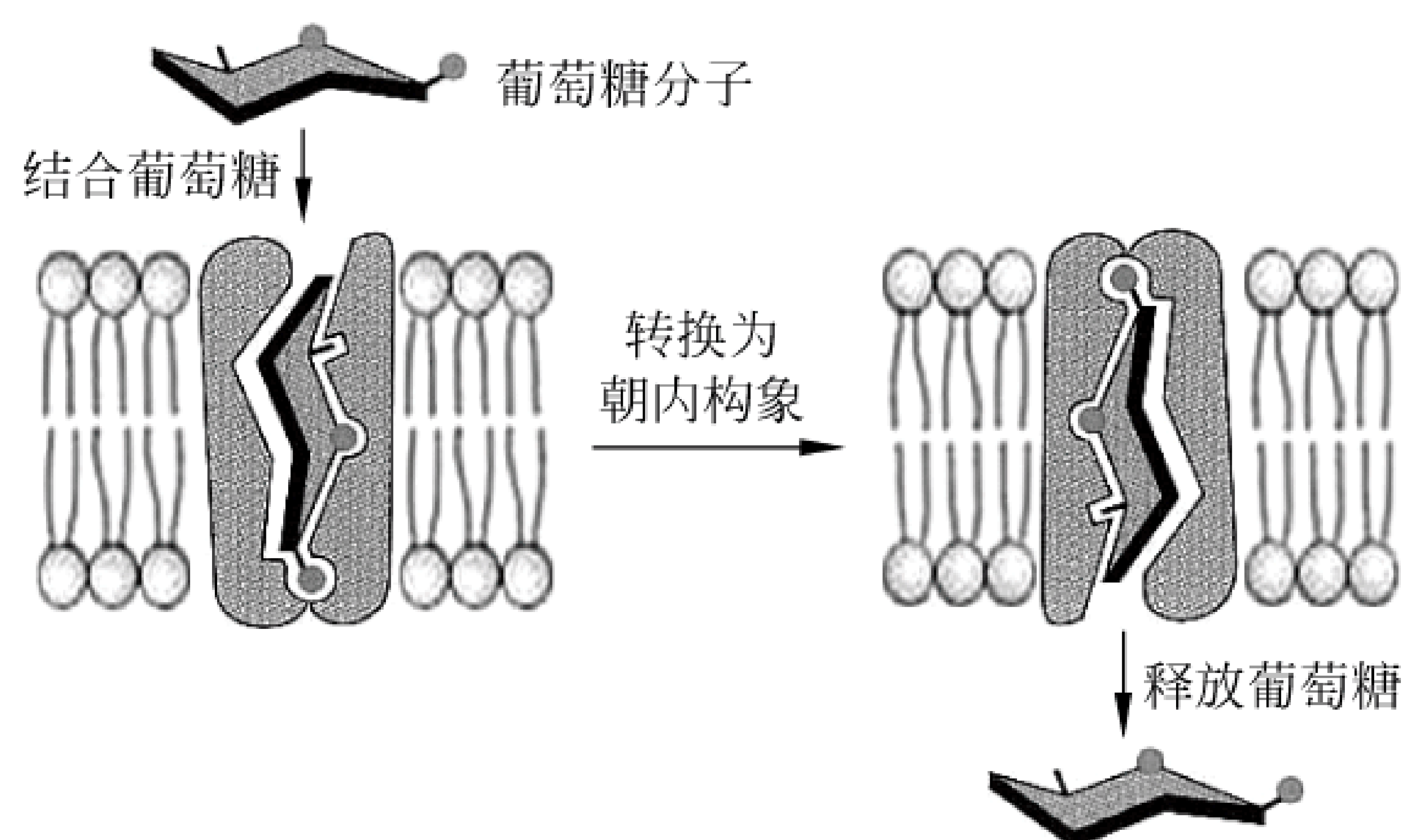


图 7.24 易化扩散

葡糖通透酶变换于向胞外"开"和向胞质"开"两种构象之间,结合葡萄糖并将它转运到红细胞内

易化扩散的另一个例子是人红细胞膜的氯离子-碳酸氢根离子交换蛋白(chloride-icarbonate exchanger),也称为阴离子交换蛋白(anion exchange protein)(图 7.25)。在组织中 CO_2 扩散入红细胞内,在碳酸酐酶催化下转换为溶解性更高的 HCO_3^- 形式。然后 HCO_3^- 再经阴离子交换蛋白排到血液中,而血液的 Cl^- 进入红细胞内。当携带溶解了 HCO_3^- 的血液到达肺时,HCO_3^- 经阴离子交换蛋白重新进入红细胞,而 Cl^- 从红细胞中排出。HCO_3^- 在碳酸酐酶催化下重新生成 CO_2 并扩散到血液中,最终经肺排放掉。

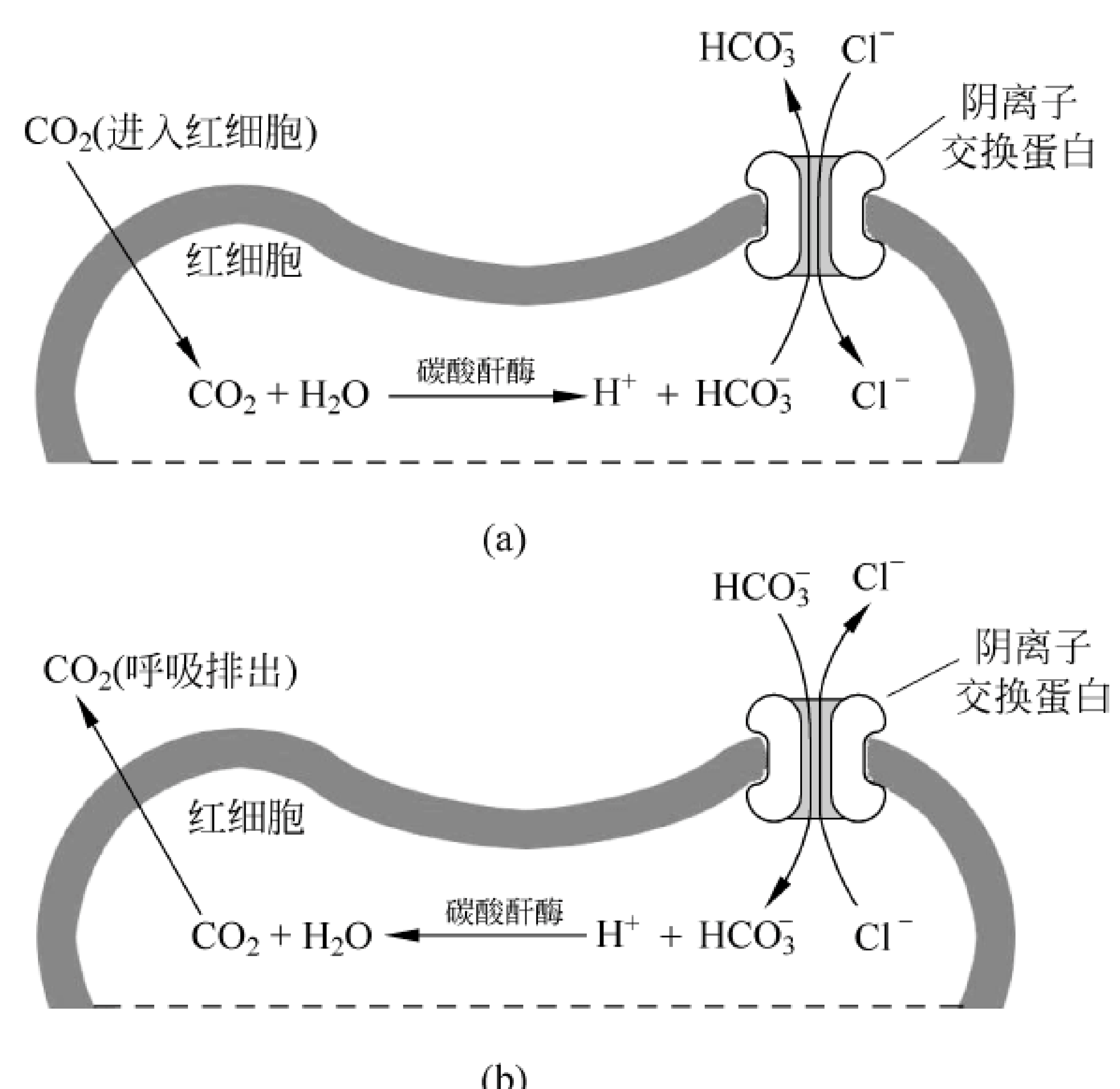


图 7.25　人红细胞阴离子交换蛋白的作用

(a) 在组织中；(b) 在肺部

7.9.2　主动转运

主动转运是一类需要能量的逆溶质浓度梯度的转运过程。主动转运又细分为初级主动转运(primary active transport)和次级主动转运(secondary active transport)。初级主动转运直接由像 ATP 那样的能源驱动,而次级主动转运是由离子浓度梯度驱动的。

下面以 Na^+-K^+ ATP 酶为例,说明 ATP 水解驱动的初级主动转运过程和伴随的葡萄糖次级主动转运过程(图 7.26)。在大得多细胞动物中,当细胞外存在的 K^+ 浓度约为 5mmol/L 时,大多数细胞能使细胞内 K^+ 浓度维持在约 140mmol/L,当细胞外存在的 Na^+ 浓度约为 145mmol/L 时,细胞内 Na^+ 浓度被维持在 5～15mmol/L。

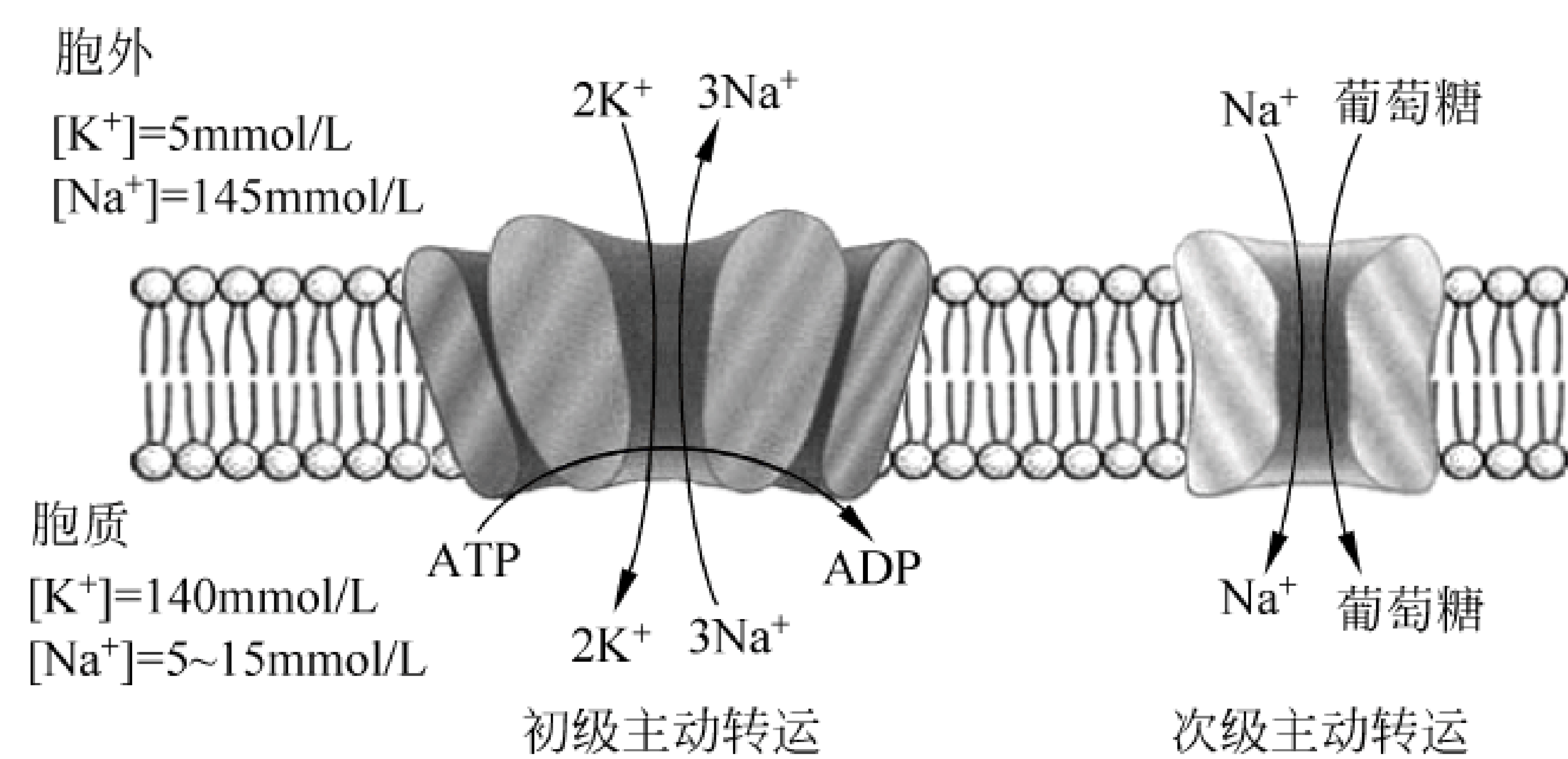


图 7.26　动物中的初级主动转运和次级主动转运

维持这些离子浓度梯度靠的是 Na^+-K^+ ATP 酶,它是 ATP 驱动的反向转运系统。每一分子 ATP 水解,就将两个 K^+ 泵入细胞内,而将 3 个 Na^+ 弹出细胞。每个 Na^+-K^+ ATP 酶每分钟可以催化约 100 分子 ATP 水解,约占一个典型的动物细胞消耗的总能量的 1/3。

在动物的小肠中,通过 Na^+-K^+ ATP 酶产生的 Na^+ 梯度是葡萄糖的次级主动转运的主要能量。图7.26表明随着每个 Na^+ 离子进入细胞的同时也有一分子葡萄糖输入到细胞内。

7.9.3 胞吞和胞吐

以上讨论的都是分子或离子的跨膜转运,然而细胞也需要输入和输出那些由于太大而不能借助转运蛋白转运的大分子。原核生物在它们的质膜和外膜中具有专业化的多组分输出系统,使得它们能够将某些蛋白质(往往是些毒素或酶)分泌到细胞外介质中。在真核细胞中,许多(但不是全部)蛋白质(和某些大的物质)输入和输出细胞分别通过胞吞(作用)(endocytosis)和胞吐(作用)(exocytosis)实现的(图7.27)。这两种情况都涉及一种专业化类型的有被小泡的形成。

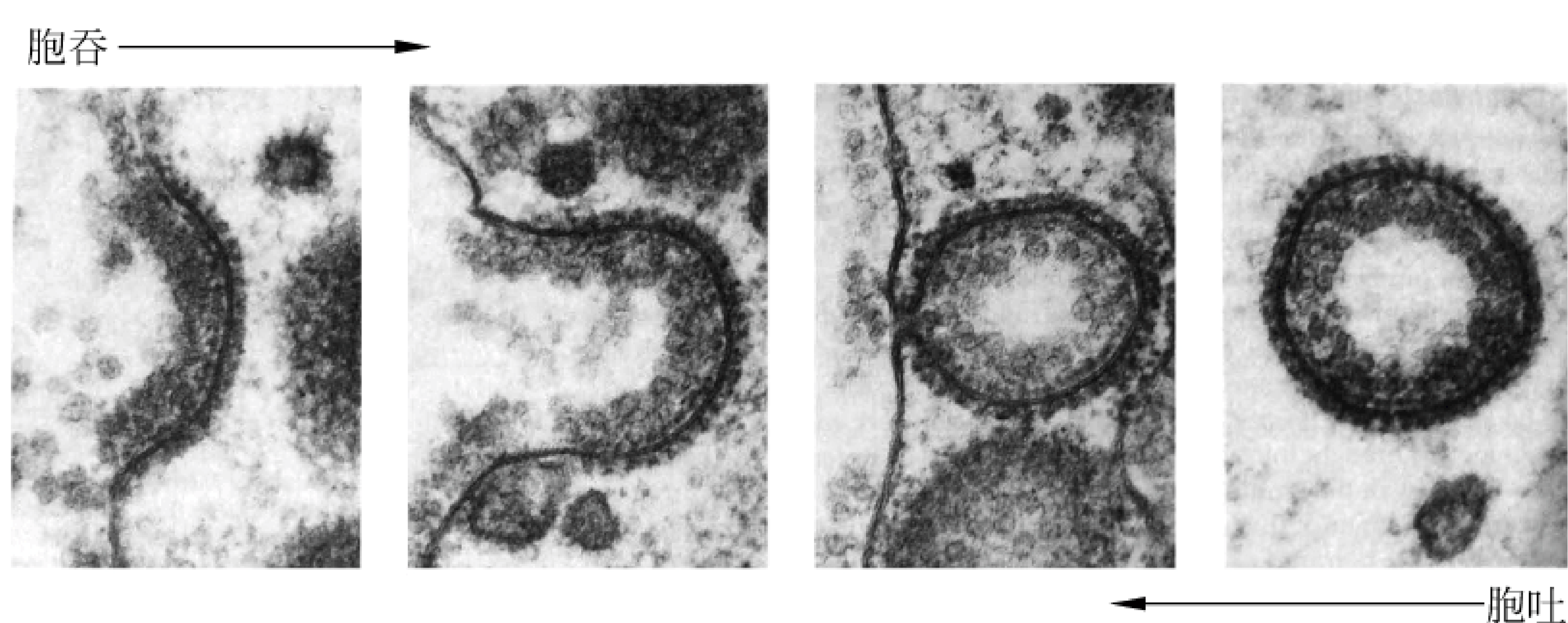


图7.27 胞吞的电子显微照片

蛋白质和某些其他大的物质被质膜吞入并带入细胞内(以脂小泡形式)。受体介导的胞吞开始是大分子与细胞的质膜上的受体蛋白结合,质膜内陷,含有输入大分子的有被小泡(图7.27)(也称为内吞小泡)出现在细胞内。从拓扑学上看,有被小泡内等价于细胞外,所以实际上小泡内的大分子并没有跨过质膜。在胞内的小泡与胞内体融合,然后,再与溶酶体融合,胞吞的物质被释放。

除了转运方向相反外,胞吐过程可以说是胞吞的逆过程。在胞吐中,细胞要分泌的蛋白质被包裹在小泡内,然后与质膜融合,最后将小泡内的包容物释放到细胞外介质中。消化酶酶原就是通过这种方式从胰腺细胞转运出去的。

7.10 信号转导

一个细胞为了与外部环境发生作用,或者说响应外来信号,它必须能够感受到细胞质膜外分子,并把它的信息传递到细胞内,这一过程称为信号转导(signal transduction)。图7.28给出了常见的跨膜信号转导机制。

配体(外部刺激)与靶细胞表面上的受体结合,相互作用后产生一个信号,该信号再经由转导蛋白转导至与膜结合的效应酶。效应酶作用产生第二信使,可扩散的第二信使再将信号带到终端。终端可能处于胞质、细胞内区室或核内。

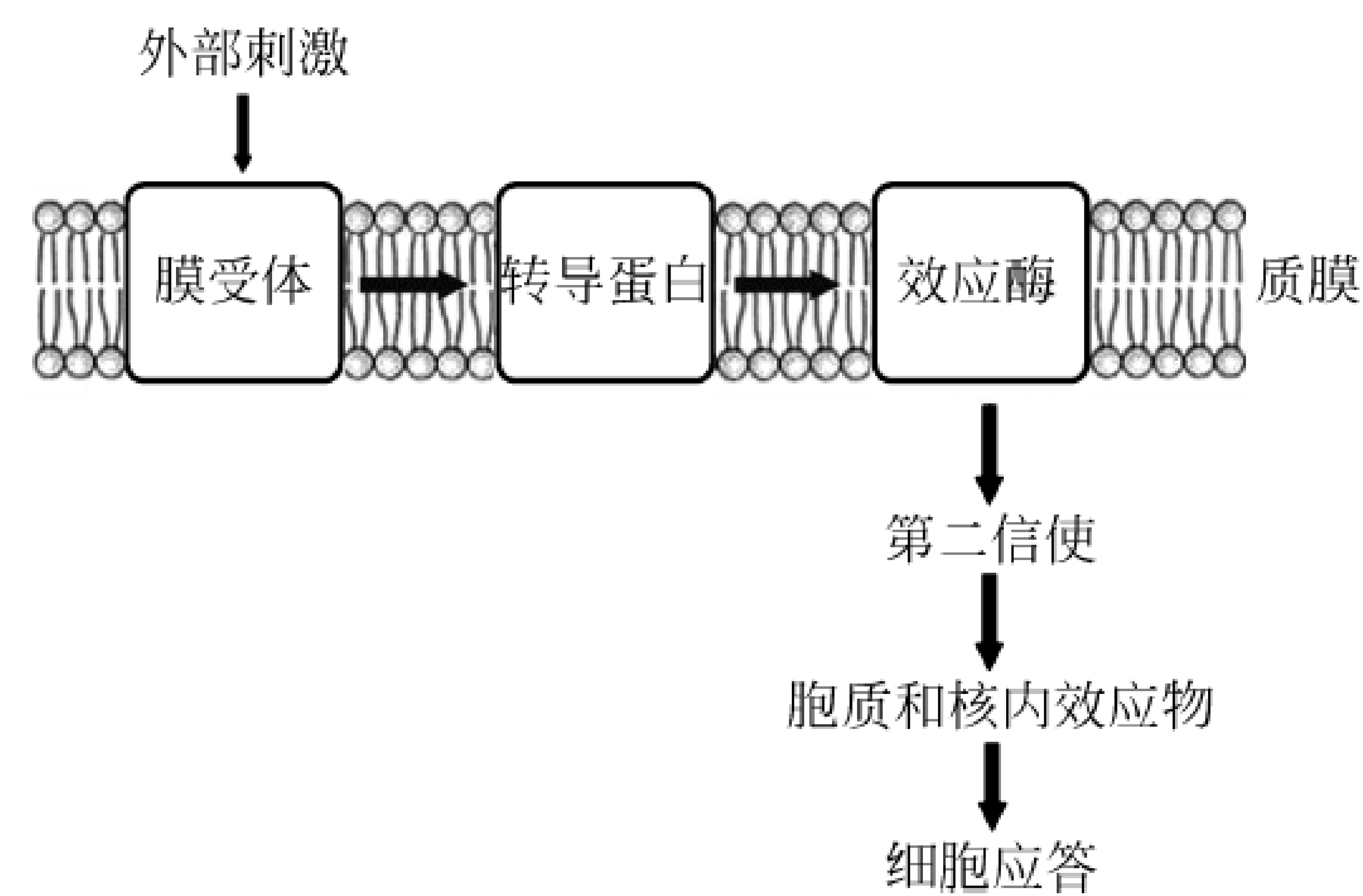


图 7.28 常见的跨膜信号转导机制

信号转导是现在研究的一个非常活跃的领域。本节将首先简要介绍激素，然后描述腺苷酸环化酶、肌醇磷脂及受体酪氨酸激酶等最常见的信号转导途径的基本机制。

7.10.1 激素

激素(hormone)是生物体内一类化学信息分子，由内分泌腺或一些特殊组织合成和不需要管道直接分泌到血液，经血液运输到相应的靶细胞。除了某些类固醇激素经扩散通过细胞膜直接作用于胞内受体外，其他大部分激素，例如肾上腺素、胰岛素等首先都是与靶细胞表面特异的受体结合，将信号转导入细胞内，引发细胞内一系列生物效应(图 7.29)。

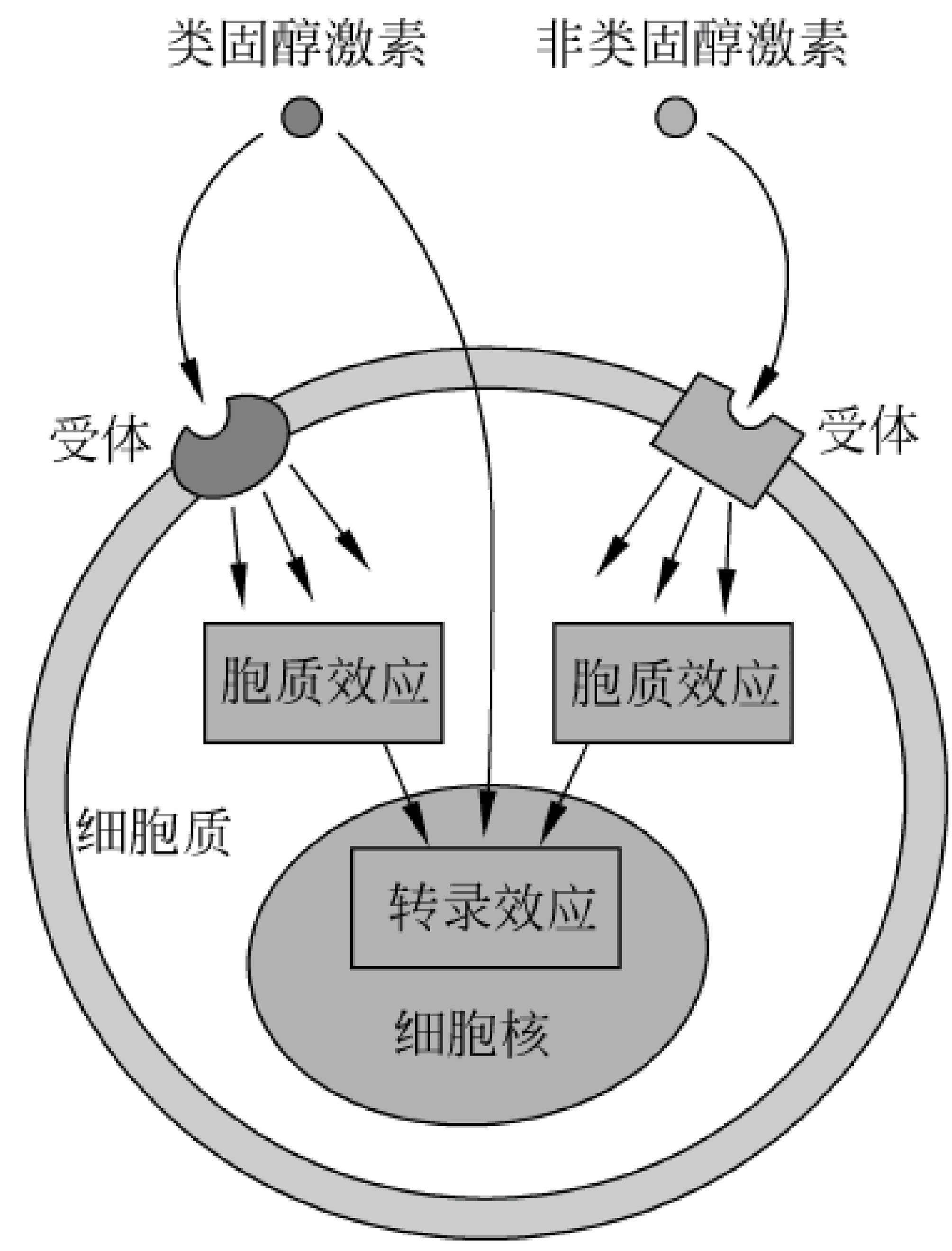


图 7.29 激素作用机制

类固醇激素或与质膜受体结合，引发胞质效应，或扩散到细胞核，引发转录效应；非类固醇激素只与质膜受体结合，引发胞质效应

激素主要分为 3 种类型：类固醇类、氨基酸衍生物类和肽类激素。类固醇激素都是胆固醇的衍生物，包括糖皮质激素(皮质醇和皮质酮)、盐皮质激素(醛固酮)、维生素 D 和性激素(睾酮和孕酮)主要作用是调节糖、脂和蛋白质的代谢，盐和水的平衡，性特征和性功能的发育。类固醇激素通过两条途径发挥作用：①扩散过膜进入细胞，移动到核内，起着转录调节

剂作用,调节基因表达。但这种调节作用涉及新蛋白质的合成,所以效果出现需要时间较长,通常要数小时或数天。②类固醇激素与细胞膜受体结合,通过受体引发胞质效应。例如作用于膜上,直接调节配体-门控离子通道等过程,这种调节方式见效快,只需数秒或数分钟时间。

氨基酸衍生物类,例如肾上腺素和甲状腺素等,作用是调节平滑肌收缩和舒张、血压、心率及脂解和糖原分解过程。肽类激素是最大的一类激素,调节所有体内组织的代谢,还包括调节其他激素的释放。第一个发现的肽类激素是胰腺分泌的胰岛素,它调控葡萄糖的利用,促进蛋白质、脂肪酸和糖原的合成。

7.10.2 腺苷酸环化酶信号转导途径

图7.30给出了腺苷酸环化酶信号转导途径。这类信号转导途径都是激素与受体结合,引起受体与鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(guanine nucleotide-binding protein,简称G蛋白)相互作用。G蛋白起着转导蛋白的作用,像一个中介将外部刺激传送给效应酶。

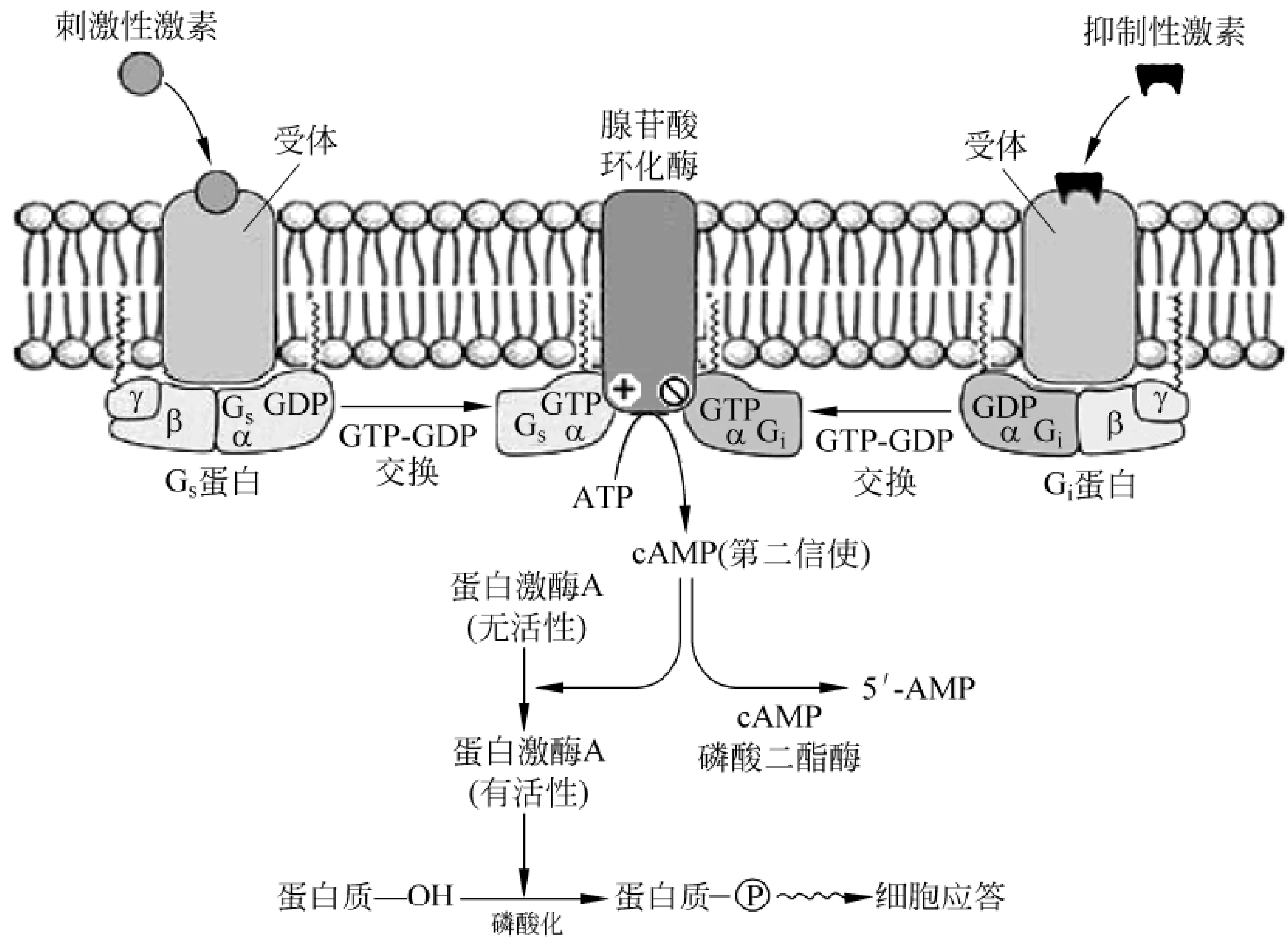


图7.30 腺苷酸信号转导途径

激素与跨膜激活受体结合激活膜内侧的刺激性G蛋白(G_s),G_s蛋白激活内在膜蛋白腺苷酸环化酶。该酶再催化ATP生成cAMP。cAMP激活蛋白激酶A,使得细胞内蛋白质磷酸化,最后引起细胞应答

G蛋白具有GTP酶(GTPase)活性,可催化鸟苷-5′-三磷酸水解为鸟苷-5′-二磷酸。当GTP结合G蛋白时,G蛋白处于可进行信号转导的活性状态。当GDP结合G蛋白时,则没有这个信号转导功能。每个G蛋白由α、β和γ亚基组成。α亚基和γ亚基都是脂质锚定膜蛋白,α亚基为脂酰锚定蛋白,而γ亚基为异戊二烯锚定蛋白。$G_{\alpha\beta\gamma}$和GDP的复合物没有活性。

当一个激素与细胞表面相应受体结合时,引起受体构象改变,促进受体与G_s蛋白之间

的相互作用，激活了 G_s（结合有 GDP 的 $G_{\alpha\beta\gamma}$），变成活性构象。结合的 GDP 快速与 GTP 交换，促进 G_α-GTP 与 $G_{\beta\gamma}$ 解离。激活的 G_α-GTP 然后与跨膜的效应酶腺苷酸环化酶相互作用，激活该酶。G_s 蛋白的 GTP 酶活性催化 GTP 水解为 GDP。当 G_α-GTP 被水解后，G_α-GDP 复合物再与 $G_{\beta\gamma}$ 聚合，重新形成 $G_{\alpha\beta\gamma}$。激活的腺苷酸环化酶催化由 ATP 形成第二信使 cAMP（环腺苷酸）（图 7.31）。

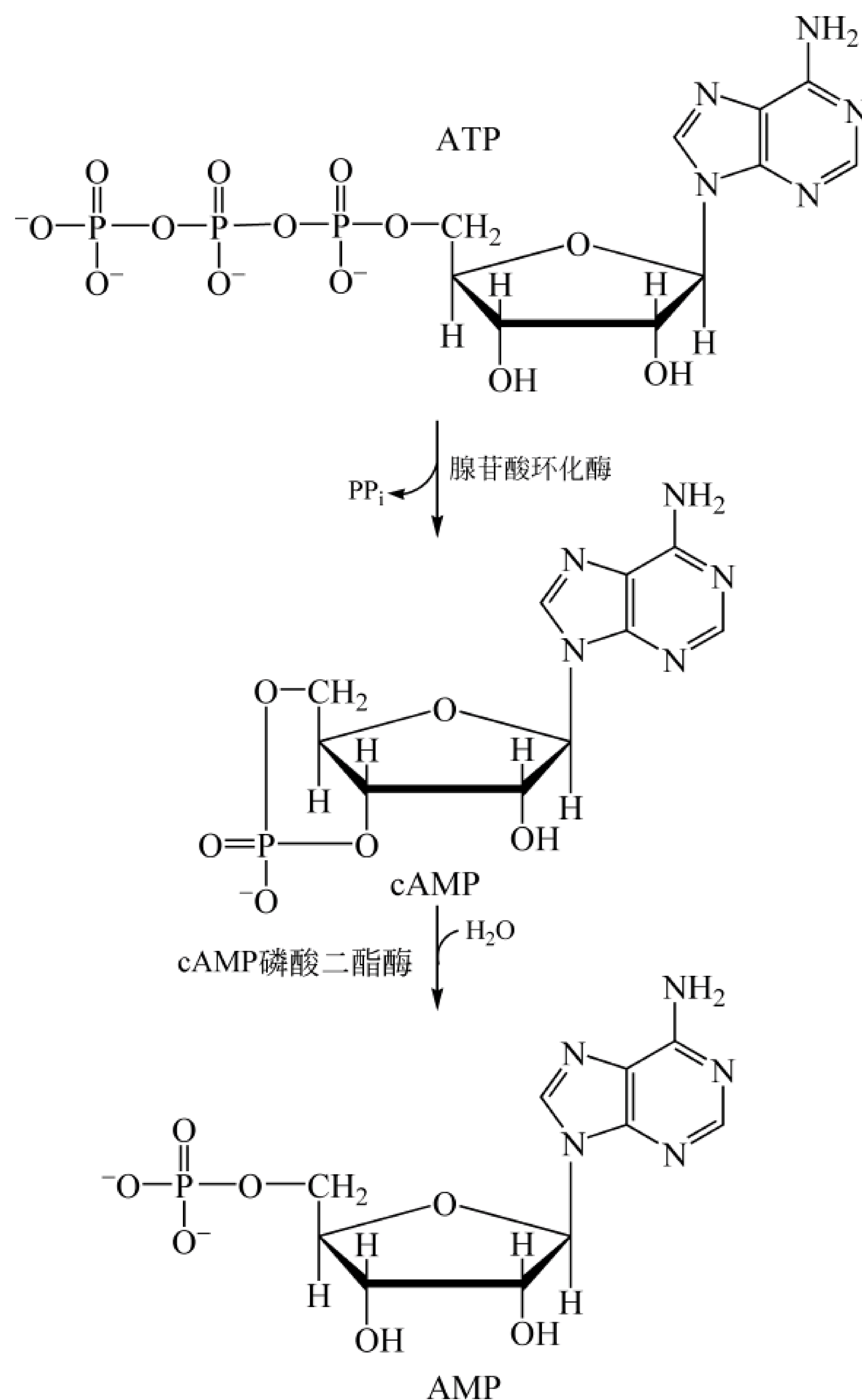


图 7.31　cAMP 的生成和失活

在跨膜的腺苷酸环化酶催化下 ATP 转化为 cAMP。作为第二信使的 cAMP 经胞质中 cAMP 磷酸二酯酶作用转为失活形式 5′-AMP

生成的 cAMP 从膜上扩散到胞质溶胶中，并激活一个蛋白激酶 A。这个激酶是由两个调节亚基和两个催化亚基组成的，但完整组装状态的酶处于非活性状态，用 R_2C_2 表示，R 是调节亚基，C 是催化亚基。当通过腺苷酸环化酶转导作用使得胞质溶胶中 cAMP 的浓度增加时，4 分子 cAMP 就会与 R_2C_2 中的 2 个 R 亚基反应生成 $2R(cAMP)_4$，并释放出 2 个 C 亚基，此时游离的 C 亚基具有蛋白激酶催化活性（图 7.32）。

具有活性的蛋白激酶 A 催化亚基能使许多蛋白质和酶磷酸化，磷酸化一般都发生在位于活性部位的丝氨酸或苏氨酸残基上。可被磷酸化的蛋白质的种类很多，有些酶（例如糖原

合酶和丙酮酸激酶)磷酸化后活性降低；有些酶(例如激素敏感性脂酶和磷酸化酶激酶)磷酸化后被激活。为使糖原分解，磷酸化酶激酶应当催化糖原磷酸化酶磷酸化，将它由非活性形式转化为活性形式。

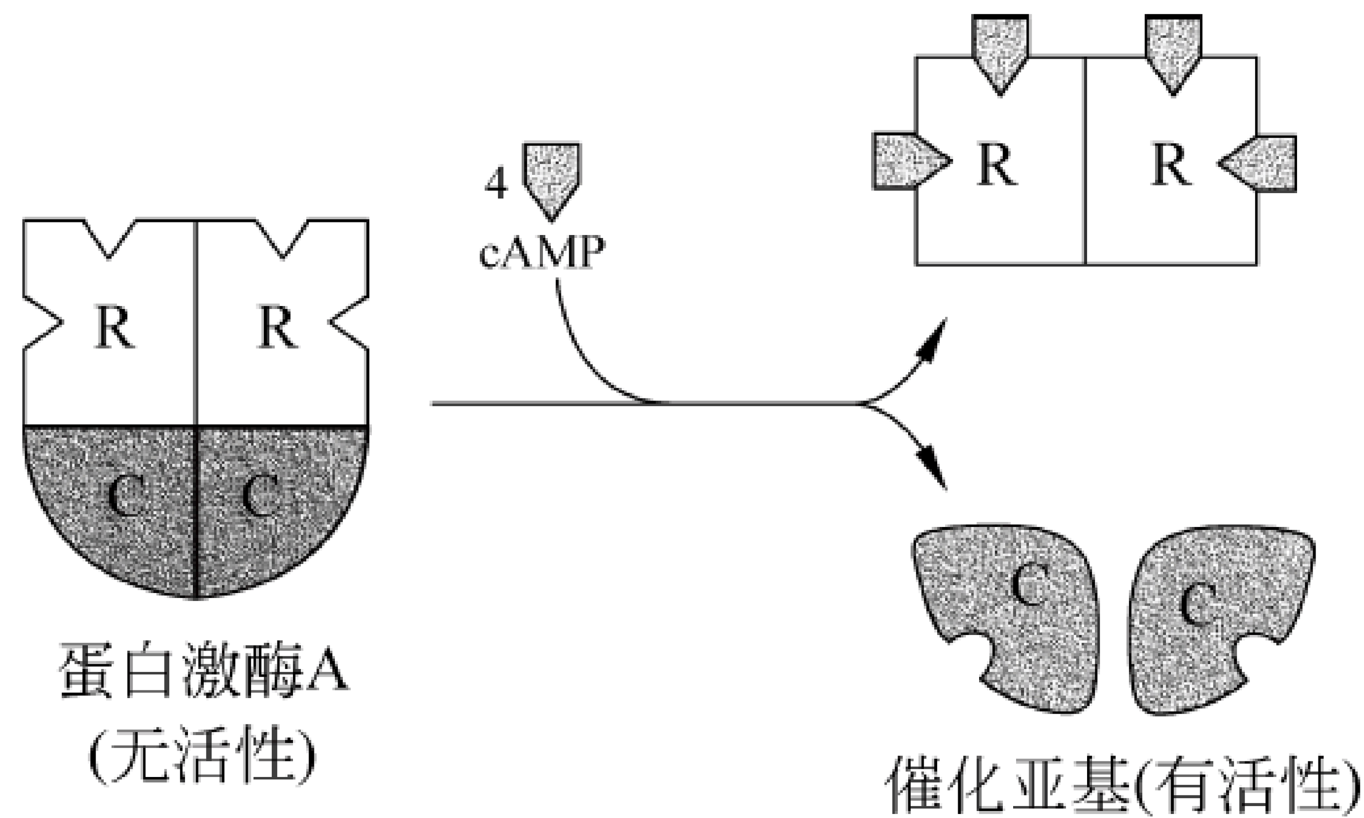


图 7.32 蛋白激酶 A 被 cAMP 激活

然而，胞质中 cAMP 浓度增加只是短暂的，一种可溶性 cAMP 磷酸二酯酶可催化 cAMP 水解为 AMP，限制了它的第二信使的寿命。高浓度甲基化嘌呤，例如咖啡因和茶碱抑制磷酸二酯酶会降低 cAMP 转化为 AMP 的速率，延长和增强了 cAMP 的作用，使刺激性激素持续活跃。

另外，在图 7.32 中可看到与激活受体结合的激素激活了腺苷酸环化酶，提高了细胞内的 cAMP 水平。而与抑制受体结合的激素通过受体与转导蛋白 G_i 之间相互作用抑制腺苷酸环化酶。因此，细胞对激素的应答取决于存在的受体类型和与它偶联的 G 蛋白的类型。

7.10.3 肌醇磷脂信号转导途径

另外一个主要的信号转导途径产生两个不同的第二信使：肌醇三磷酸(inositol 1,4,5-trisphosphate，IP_3)和二酰甘油(diacylglycerol，DAG)，它们都是质膜磷脂磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate，PIP_2)的衍生物。信号转导开始也像图 7.30 那样，配体与细胞膜上特异受体结合后，信号经另一种 G 蛋白(G_q)转导。激活的结合了 GTP 的 G_q 激活位于质膜的效应酶磷脂酶 C(phospholipase，PLC)，然后 PLC 催化 PIP_2 水解生成 IP_3 和 DAG，IP_3 和 DAG 都是可将初始信号传送到细胞内的第二信使(图 7.33)。

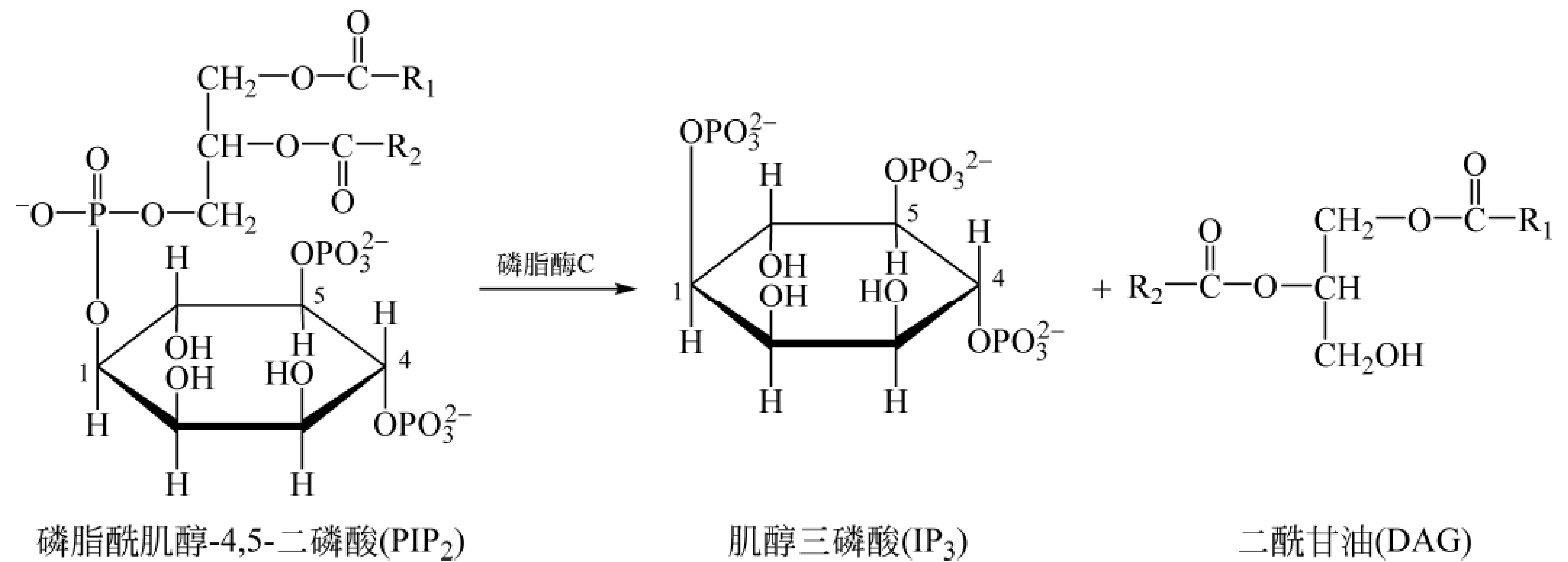


图 7.33 磷脂酶 C 催化反应

PIP_2 生成两种第二信使 IP_3 和 DAG

当 IP_3 经由胞质扩散至内质网，并与内质网膜的钙通道结合，使得钙通道打开，Ca^{2+} 由内质网腔内释放到胞质。Ca^{2+} 也是一个细胞内信使，因为它可激活钙依赖性蛋白激酶，该激酶催化不同靶蛋白磷酸化。由于在通道关闭之前要将 Ca^{2+} 泵回内质网腔内，所以 Ca^{2+} 的寿命很短。

PIP_2 的另一个水解产物 DAG 维持在质膜内。蛋白激酶 C 由细胞质移动到质膜内表面，在与内表面短暂结合时被 DAG 和 Ca^{2+} 激活。蛋白激酶 C 催化许多靶蛋白质的磷酸化，改变它们的催化活性。蛋白激酶 C 存在几种同工酶，每种都有不同的催化特性和组织分布。

7.10.4　受体酪氨酸激酶

胰岛素和许多生长因子受体的功能与 G 蛋白无关，它们的受体是一种称为酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase，RTK)的多功能跨膜蛋白，这单一膜蛋白汇集了受体、转导蛋白和效应分子功能(图 7.34)。

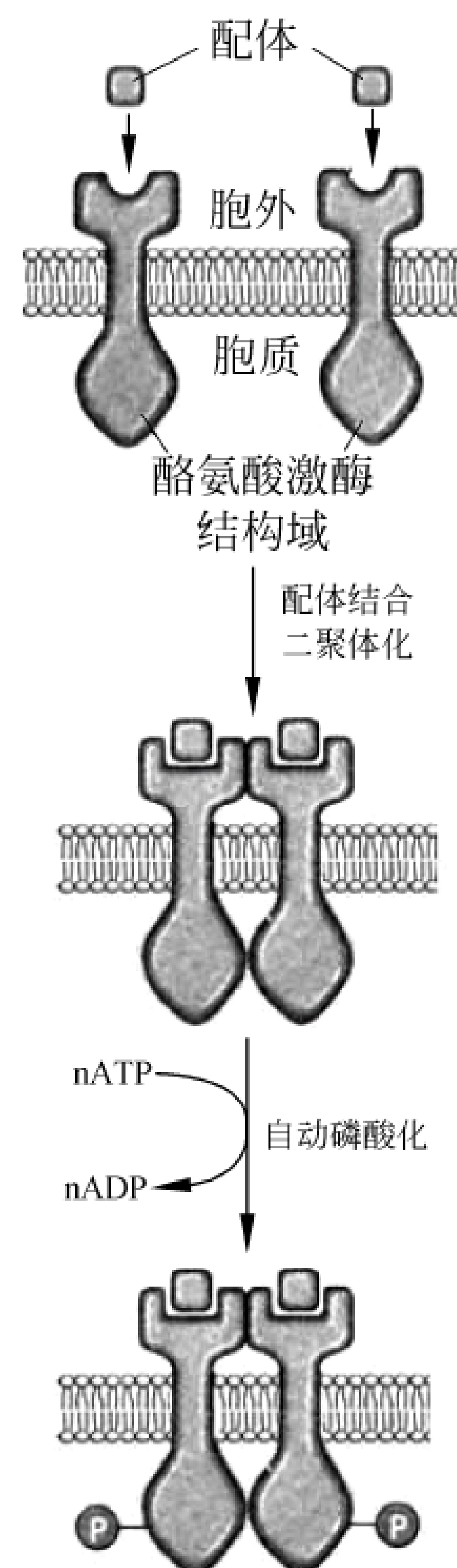


图 7.34　受体酪氨酸激酶的激活

配体诱导受体二聚体化，每个激酶结构域催化另一激酶结构域的磷酸化。磷酸化后的二聚体可催化各种靶蛋白的磷酸化，引起细胞的应答

在一种类型的激活方式中，配体结合受体的细胞外结构域，使该受体二聚体化激活细胞内酪氨酸激酶结构域的催化活性。当两个受体分子会合时，每个酪氨酸激酶结构域催化对方中特殊酪氨酸残基的磷酸化。然后激活的酪氨酸激酶再催化胞质中一些蛋白质磷酸化，在细胞内爆发一些代谢途径的级联反应。

图7.35给出了胰岛素受体的示意图。胰岛素受体是一个$\alpha_2\beta_2$四聚体。α亚基含有胰岛素结合结构域,而β亚基含有酪氨酸激酶功能的结构域。一旦胰岛素与突出到质膜外表面的α亚基结合,就诱导它的构象变化,引起质膜中两个β亚基的酪氨酸激酶结构域结合,两个结构域彼此催化对方结构域自磷酸化,激活β亚基结构域的酪氨酸激酶活性。激活的酪氨酸激酶再催化细胞内其他蛋白的酪氨酸残基磷酸化。这些蛋白的磷酸化可帮助有机体调控营养物的利用。

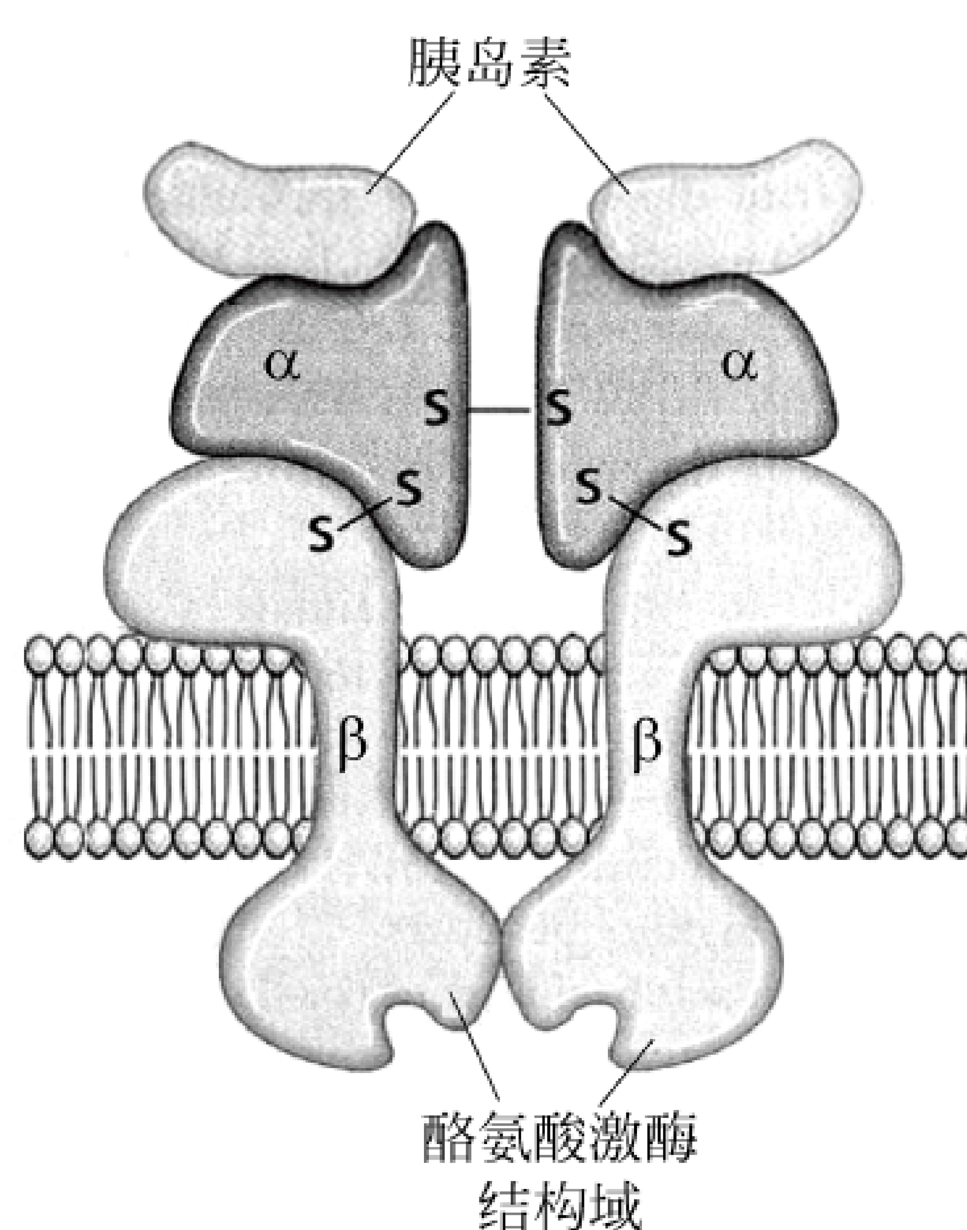


图7.35 胰岛素受体

受体的两个胞外α亚基,每个都有一个胰岛素结合部位,α亚基与跨膜的β亚基相连。每个亚基都含有一个酪氨酸激酶结构域。胰岛素一结合α亚基,每个β亚基的酪氨酸激酶结构域就催化相邻激酶结构域中酪氨酸残基自磷酸化

此外,激活的酪氨酸激酶还可使膜上或胞质溶胶中的其他蛋白质磷酸化,例如胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate, IRS-1)磷酸化,磷酸化的IRS-1再与含有称为Src同源2(SH2)结构域(因与已知的Src蛋白的一个结构域序列相似而命名)的蛋白质结合,导致生理效应的发生。

包括生长因子在内的许多其他因子,它们的作用机制类似于胰岛素,但其中的一些生长因子可以直接与含有SH2结构域的蛋白质结合,激活这些蛋白质,通过它们实现细胞应答。

小结

1. 脂肪酸是由长的烃链"尾"和末端的羧基"头"组成,在生理条件下羧基呈解离状态。自然界存在的大多都是偶数碳脂肪酸,碳数范围为12~20。

2. 甘油磷脂有一个极性头部和与甘油骨架相连的非极性烃链尾部。

3. 鞘脂的骨架是鞘氨醇,而不是甘油。鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂是3种主要的鞘脂。鞘脂常出现在植物和动物膜中。

4. 胆固醇是含有4个稠环的类异戊二烯。胆固醇是生物膜的成分,也是胆固醇类激素生物合成的前体。

5. 所有生物膜的结构基础是包含像甘油磷脂、鞘脂那样的两性脂及一些胆固醇的脂双

层。膜的流动性与温度和组成有关，当温度超过 T_m 时处于凝胶相膜转换为液晶相。当脂双层中插入胆固醇后，膜流动性降低。

6. 生物膜含有镶嵌在或与脂双层相连的膜蛋白。蛋白质可以在膜内横向扩散。

7. 大多数内在膜蛋白横跨脂双层的疏水内部，但外周膜蛋白与膜表面松散结合。脂锚定膜蛋白与脂双层中膜脂共价结合。一些小的或疏水分子能够扩散过膜。通道蛋白、孔蛋白，以及被动扩散和主动转运参与离子和极性分子跨膜移动。大分子可以分别通过胞吐和胞吐进出细胞。

8. 激素是由内分泌腺或一些特殊组织分泌到血液的一类化学信息分子。类固醇类激素可扩散进细胞内，移动到细胞核引发转录效应，或与质膜受体直接作用，引发胞质效应。非类固醇激素与质膜受体结合，引发胞质效应。

9. 细胞外化学刺激通过与受体结合将它们的信号传输到细胞内。转导蛋白将信号转给效应酶，产生第二信使。信号转导途径通常包括 G 蛋白和蛋白激酶。

10. 腺苷酸环化酶信号转导途径导致依赖 cAMP 的蛋白激酶 A 激活。肌醇磷酸信号转导途径产生两个第二信使，导致蛋白激酶 C 的激活和胞质中 Ca^{2+} 浓度的增加。在受体酪氨酸激酶中，该激酶就是受体蛋白的一部分。

习题

1. 鱼油是 ω-3 和多不饱和脂肪酸的丰富来源，而 ω-6 脂肪酸在玉米油和葵花籽油中相对丰富。将下列脂肪酸按照 ω-3、ω-6 或其他类型分类。

(a) 亚麻酸；(b) 亚油酸；(c) 花生四烯酸；(d) 油酸；(e) Δ8,11,14-二十碳三烯酸。

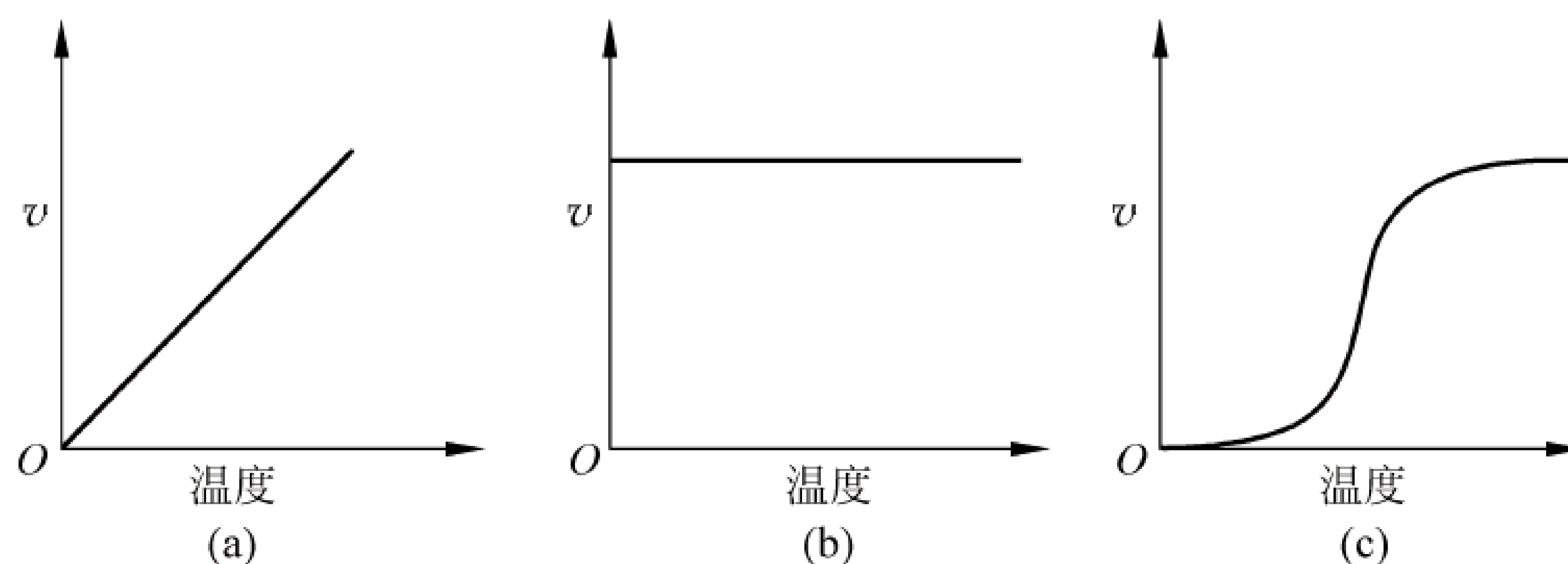
2. 硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸 4 种脂肪酸可以组成多少种不同的三酰甘油？

3. 一些药物必须在进入活细胞后才能发挥药效，但它们中大多是带电或有极性的，因此不能靠被动扩散跨膜。人们发现利用脂质体运输某些药物进入细胞是很有效的办法，试解释脂质体是如何发挥作用的。

4. 为什么生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸大多数都是顺式构型，而不是反式构型呢？它对生物膜的特性有什么贡献？

5. 一个红细胞的表面积约为 $100\mu m^2$，从 4.7×10^9 个红细胞分离出的膜在水中形成面积为 $0.890m^2$ 的单层膜。就细胞膜的构成而言，从这个实验能得出什么结论？

6. 下列三个图中 v 表示流速，哪个图中曲线显示的是离子通过离子载体穿过生物膜时流速与温度的关系？请解释。



7. Ras蛋白质是一个缺少GTP酶活性的突变的G蛋白。这一活性缺失将会怎样影响腺苷酸环化酶信号传导途径?

8. 巧克力含有化合物可可碱,结构上与咖啡因和茶碱有关。巧克力产品对狗可能有毒,甚至致命,因为这些动物代谢可可碱要比人慢得多。心脏、中枢神经系统和肾都会受到影响。狗可可碱中毒的前期信号包括恶心、呕吐、骚动不安、腹泻、肌肉震颤和尿液增加或失禁。请说说狗可可碱中毒的机制。

9. 在肌醇信号转导途径中,IP_3和二酰基甘油(DAG)都是激素型第二信使。如果细胞中某些蛋白激酶通过结合Ca^{2+}可被激活,IP_3和DAG是怎样以互补方式作用引起细胞内细胞响应的?

10. 在一些形式的糖尿病中,胰岛素受体的β亚基中的突变使该亚基的酶活性丧失。突变是怎样影响细胞对胰岛素的响应?额外给予(例如注射)胰岛素能克服这一缺陷吗?

8 核　　酸

核酸分为核糖核酸(ribonucleic acid，RNA)和脱氧核糖核酸(deoxyribonucleotide，DNA)，主要参与遗传信息的储存、传递以及破译过程，它们的构件单位是核苷酸(nucleotide)。本章首先描述核苷酸结构，然后再描述 DNA 和 RNA 两类核酸的结构和功能以及核酸的一些性质。

8.1 核苷酸和核酸一级结构

核苷酸由 3 部分组成：一个碱基、一个五碳糖核糖或脱氧核糖和一个磷酸基团(图 8.1)。

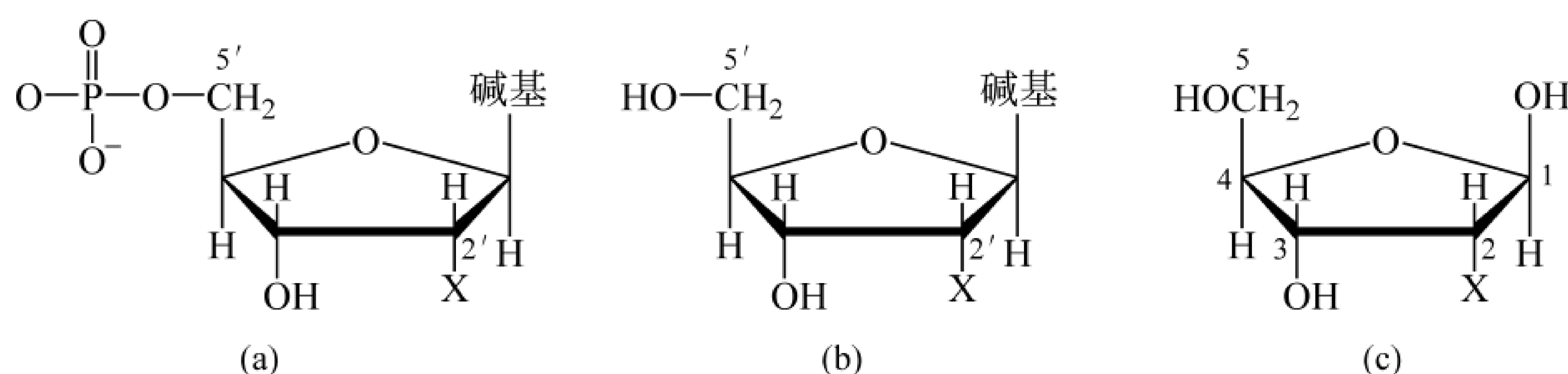


图 8.1　核苷酸、核苷和核糖结构

(a) 核苷酸(X=OH)，脱氧核苷酸(X=H)；(b) 核苷(X=OH)，脱氧核苷(X=H)；(c) 核糖(X=OH)，脱氧核糖(X=H)

8.1.1 碱基

出现在核酸中的碱基都是嘧啶或嘌呤的衍生物，通常称为嘧啶碱基和嘌呤碱基。尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶属于嘧啶碱基，腺嘌呤和鸟嘌呤属于嘌呤碱基(图 8.2)。腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶既出现在 RNA 中，也出现在 DNA 中；而尿嘧啶主要出现在 RNA 中；胸腺嘧啶出现在 DNA 中。嘌呤和嘧啶虽然是弱碱，但在生理 pH 下难溶于水。不过在细胞内，大多数嘧啶和嘌呤碱基都是以核苷酸或其聚合物成分出现，这些化合物在水中的溶解度是很高的。

由于两类碱基都含有共轭双键，这一特性使得环呈平面，具有紫外吸收，最大吸收峰出现在 260nm 左右(图 8.3)。

核苷酸的杂环碱基存在着两种互变异构形式，腺嘌呤和胞嘧啶以胺式或亚胺式存在；鸟嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶以酮式或烯醇式存在(图 8.4)。在大多数细胞的内部，胺式和酮式占优势，是最稳定的形式。

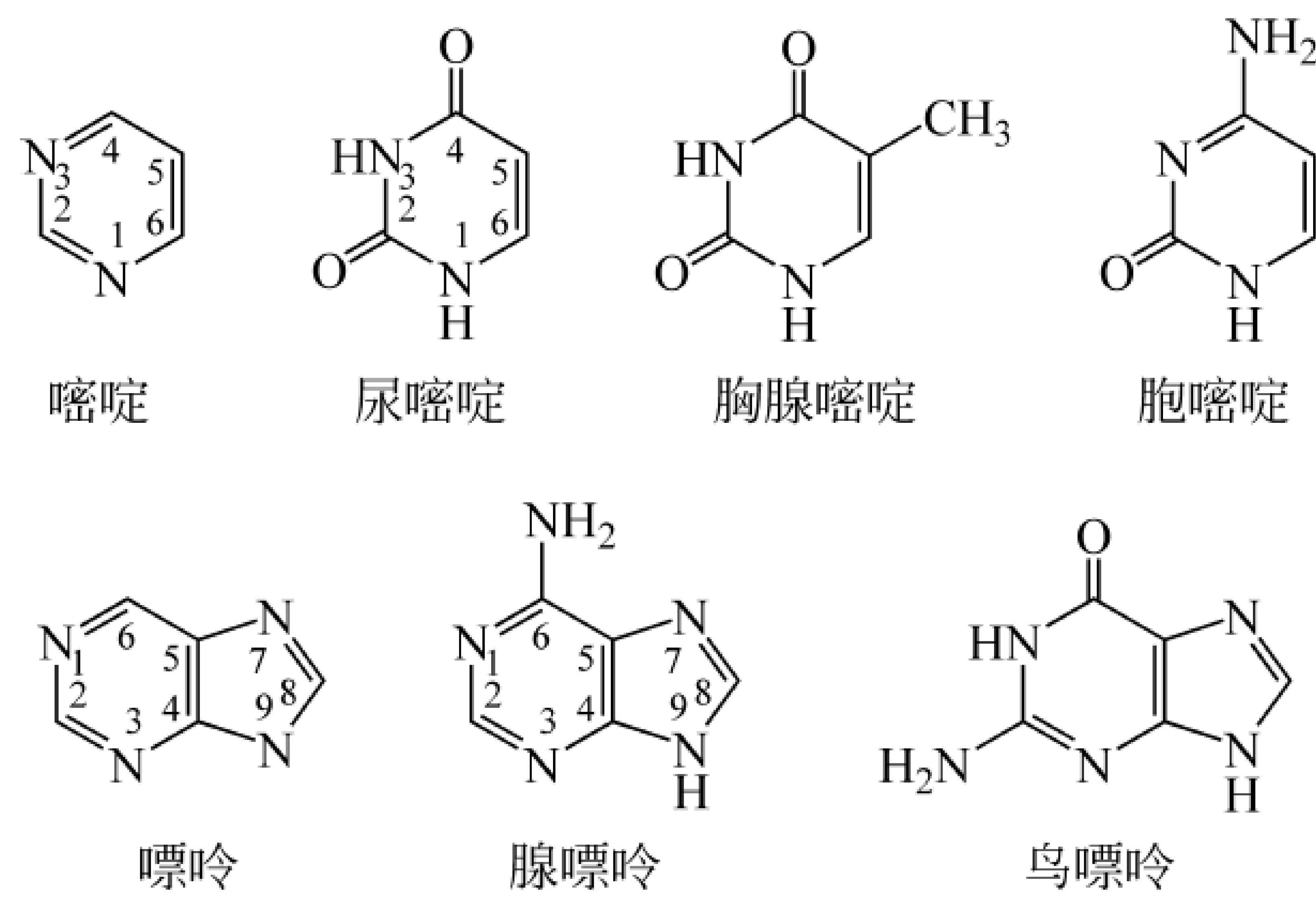


图 8.2　主要嘧啶碱基和嘌呤碱基

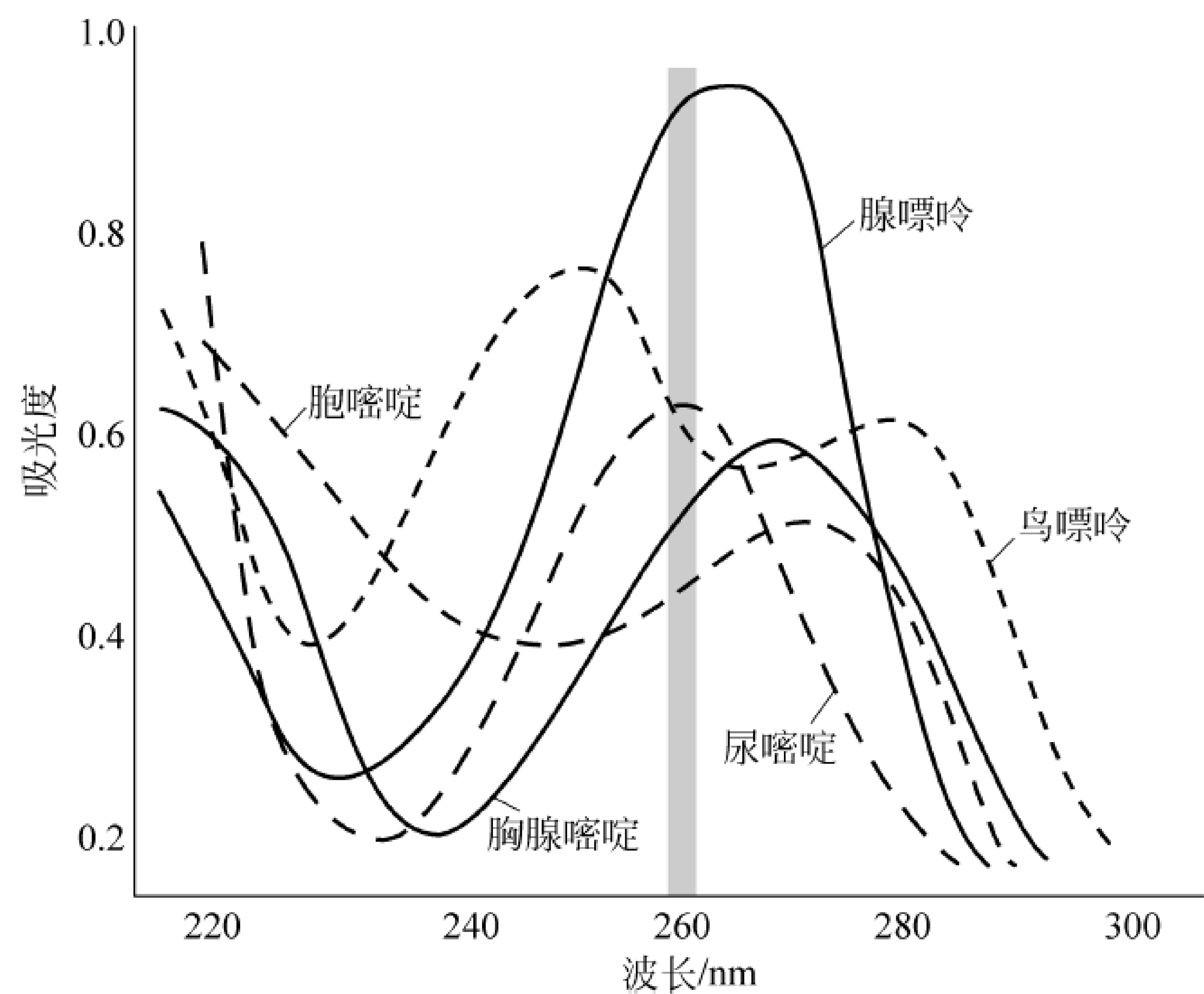


图 8.3　pH7.0 条件下嘧啶碱基和嘌呤碱基的紫外吸收光谱

8.1.2　核苷和核苷酸

核苷或脱氧核苷是核糖或脱氧核糖与嘧啶或嘌呤分别形成的 β-N-糖苷：腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷以及脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胞苷和脱氧胸苷(简称胸苷)(图 8.5)。核苷或脱氧核苷磷酸化可形成相应的磷酸酯：核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。由于核苷含有 3 个可以被磷酸酯化的羟基(2′羟基、3′羟基和 5′羟基)，脱氧核苷含有 2 个这样的羟基(3′羟基和 5′羟基)，所以磷酸基团可连在不同位置。通常说的核苷酸都是核苷(或脱氧核苷)-5′-磷酸，例如腺苷-5′-一磷酸。表 8.1 给出了碱基、核苷和核苷酸的名称和缩写。

核苷或脱氧核苷中的碱基可以绕糖苷键(N-苷键)旋转，可呈现顺式和反式构象，在核苷酸的聚合物核酸中反式构象占优势(图 8.6)。

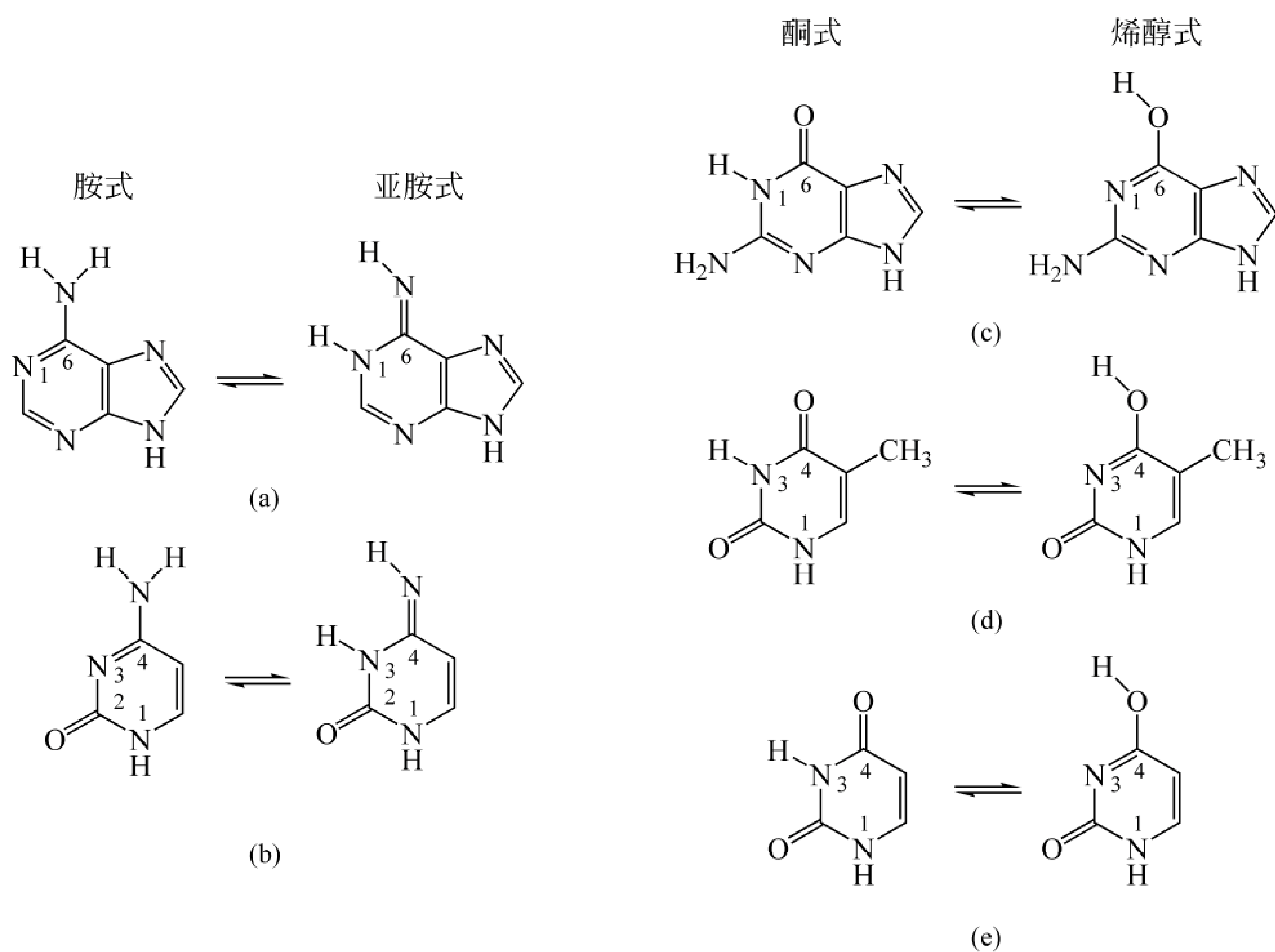


图 8.4 5 种碱基的互变异构体

(a) 腺嘌呤；(b) 胞嘧啶；(c) 鸟嘌呤；(d) 胸腺嘧啶；(e) 尿嘧啶

生理 pH 下，这些互变异构化反应的平衡倾向胺式和酮式

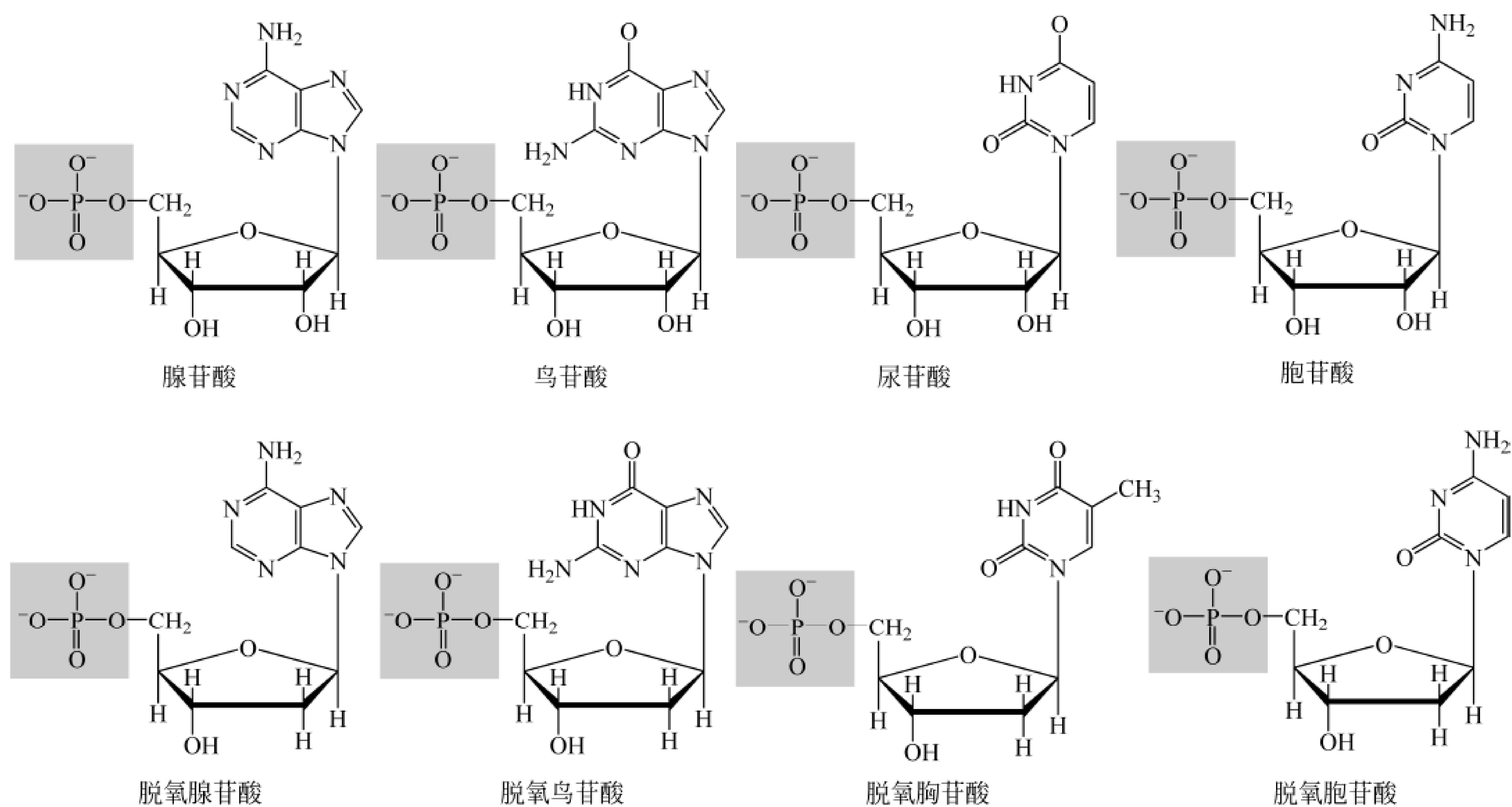


图 8.5 核苷酸和脱氧核苷酸

带有阴影部分为核苷酸和脱氧核苷酸，不带阴影部分为核苷和脱氧核苷(5′端为 OH)

表 8.1　碱基、核苷和核苷酸的名称和缩写

碱基(base)	核糖核苷(ribonucleoside)	核糖核苷酸(ribonucleotide)
腺嘌呤 (adenine) A,Ade	腺苷(adenosine) A,Ado	腺苷酸(adenylate) 腺苷-5′-一磷酸(adenosine-5′-monophosphate) A,AMP
鸟嘌呤 (guanine) G,Gua	鸟苷(guanosine) G,Guo	鸟苷酸(guanylate) 鸟苷-5′-一磷酸(guanosine-5′-monophosphate) G,GMP
胞嘧啶 (cytosine) C,Cyt	胞苷(cytidine) C,Cyd	胞苷酸(cytidylate) 胞苷-5′-一磷酸(cytidine-5′-monophosphate) C,CMP
尿嘧啶 (uracil) U,Ura	尿苷(uridine) U,Urd	尿苷酸(uridylate) 尿苷-5′-一磷酸(uridine-5′-monophosphate) U,UMP
碱基(base)	脱氧核糖核苷(deoxyribonucleoside)	脱氧核糖核苷酸(deoxyribonucleotide)
腺嘌呤 (adenine) A,Ade	脱氧腺苷 (deoxyadenosine) A,dA	脱氧腺苷酸(deoxyadenylate) 脱氧腺苷-5′-一磷酸(deoxyadenosine-5′-monophosphate) A,dA,dAMP
鸟嘌呤 (guanine) G,Gua	脱氧鸟苷 (deoxyguanosine) G,dG	脱氧鸟苷酸(deoxyguanylate) 脱氧鸟苷-5′-一磷酸(deoxyguanosine-5′-monophosphate) G,dG,dGMP
胞嘧啶 (cytosine) C,Cyt	脱氧胞苷 (deoxycytidine) C,dC	脱氧胞苷酸(deoxycytidylate) 脱氧胞苷-5′-一磷酸(deoxycytidine-5′-monophosphate) C,dC,dCMP
胸腺嘧啶 (thymine) T,Thy	脱氧胸苷 (deoxythymidine) T,dT	脱氧胸苷酸或胸苷酸(deoxythymidylate 或 thymidylate) 脱氧胸苷-5′-一磷酸(deoxythymidine-5′-monophosphate) T,dT,dTMP

8.1.3　核酸一级结构

核苷酸聚合形成核酸,交替的戊糖和磷酸基团形成多核苷酸链的共价骨架。核糖核苷三磷酸 ATP、GTP、CTP 和 UTP 聚合形成核糖核酸(RNA),而脱氧核糖核苷三磷酸 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 聚合形成脱氧核糖核酸(DNA),任一种核酸中的两个核苷酸残基间通过 3′,5′-磷酸二酯键连接(图 8.7)。

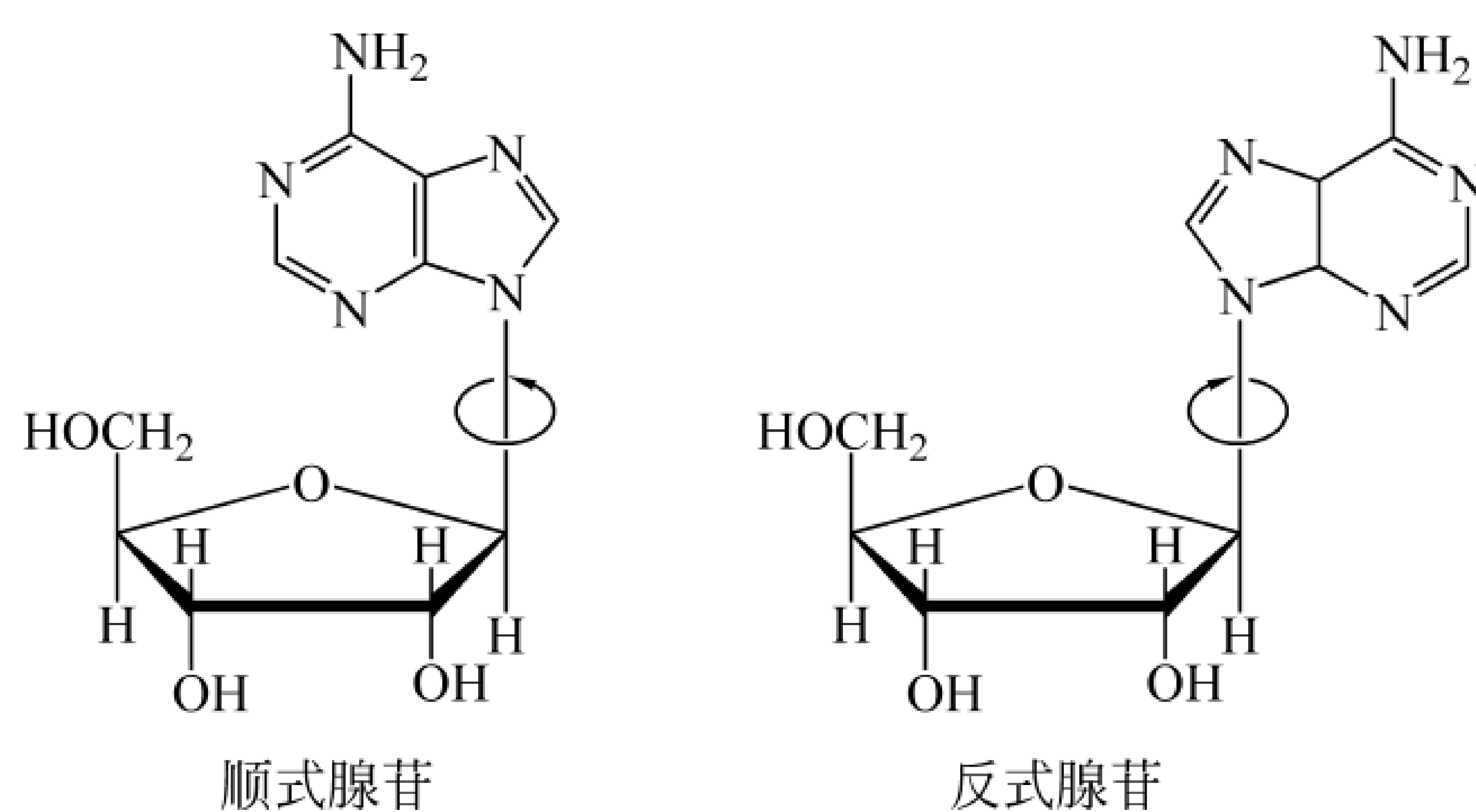


图 8.6 腺苷的顺式和反式构象

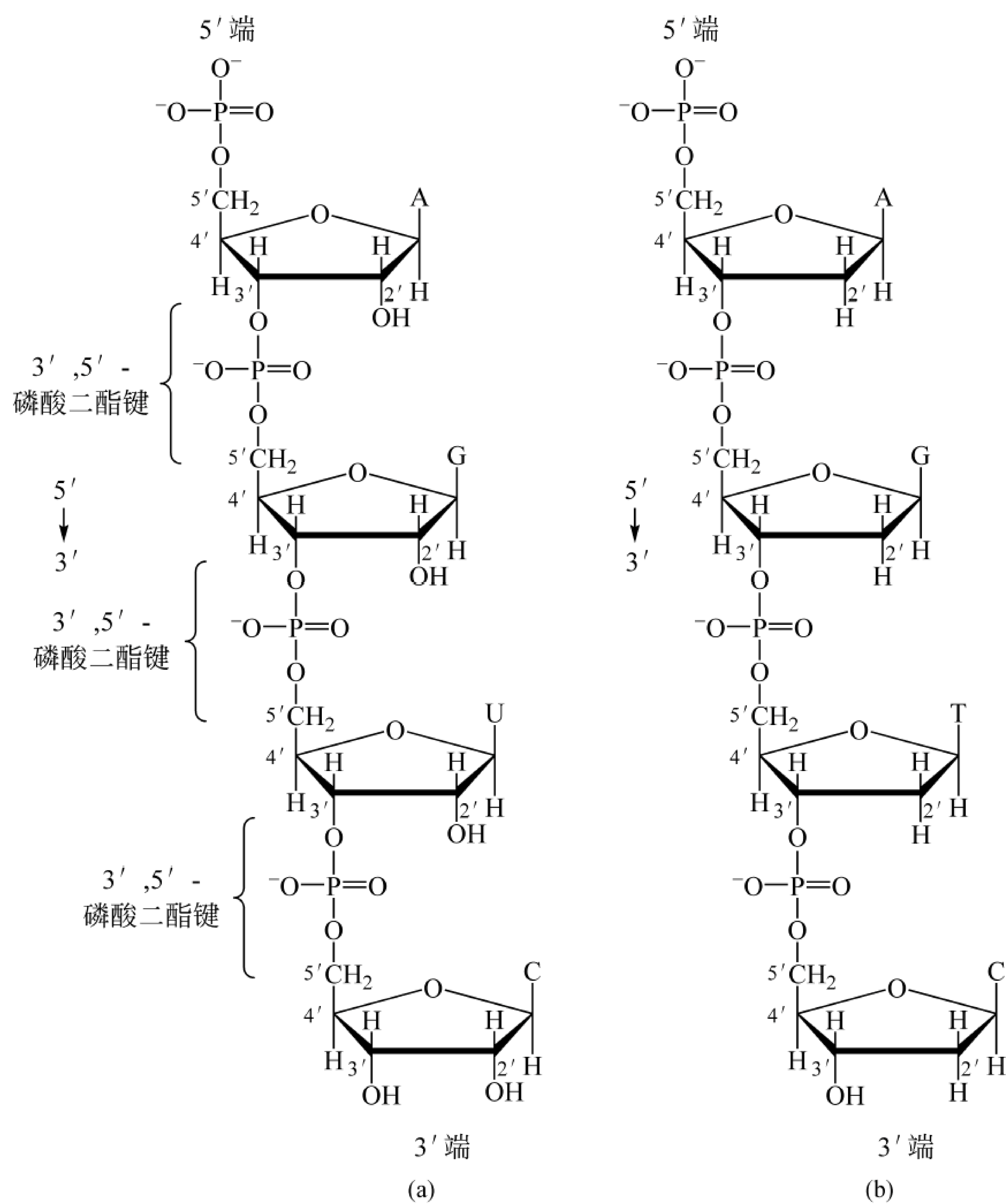


图 8.7 RNA 和 DNA 片段

(a) RNA 片段；(b) DNA 片段

核酸一级结构是由3′,5′-磷酸二酯键连接的核苷酸序列。无论是RNA,还是DNA片段,一端都是5′端,另一端为3′端,核苷酸序列沿照5′→3′方向读写。书写时磷酸用p表示,如5′-腺苷酸表示为pA,脱氧腺苷-3′-磷酸表示为dAp,以此类推,图8.8中的RNA片段序列可缩写为pApGpUpC,简化为AGUC;DNA片段序列可缩写为pdApdGpdTpdC,简化为AGTC。

8.2 DNA双螺旋和超螺旋

1944年O. T. Avery等完成了肺炎双球菌转化实验,从肺炎双球菌致病株提取的DNA可以使非致病株转化为致病株,表明携带了致病遗传信息的致病株DNA整合到了非致病株染色体中,使其转化为致病株。后来A. Hershy和M. Chase通过用核素^{32}P和^{35}S分别标记噬菌体的DNA和外壳(蛋白质部分),然后感染*E. coli*。实验也表明是标记的DNA而不是标记的蛋白质进入了*E. coli*,并提供了噬菌体复制的遗传信息。两个实验都证明DNA是遗传信息的载体。

当科学家们都认识到DNA是遗传信息载体后,DNA结构的解析就成了研究的热点。

8.2.1 DNA碱基组成——Chargaff法则

DNA结构解析的重要线索之一是Erwin Chargaff等20世纪40年代后期的研究工作。他们对来自不同种属的原核生物和真核生物的DNA样品水解物进行碱基组成分析。根据收集的分析数据,得出了以下一些有规律性的结论。

(1) 物种不同,其DNA碱基组成也不同。

(2) 同一物种的不同组织的DNA样品具有相同的碱基组成,即碱基组成没有组织和器官的特异性。

(3) 在一个给定物种中其DNA碱基组成不会随机体的年龄、营养状态或环境变化而改变。

(4) 不管物种如何不同,但在所有生物DNA中腺嘌呤碱基数总是等于胸腺嘧啶碱基数(nA=nT),鸟嘌呤碱基数总是等于胞嘧啶碱基数(nG=nC),由此可得出嘌呤总数等于嘧啶总数(nA+nG=nT+nC)(表8.2)。

表8.2 DNA的碱基组成(mol%)和碱基比例

来　源	A	G	C	T	A/T	G/C	G+C	嘌呤/嘧啶
E. coli	26.0%	24.9%	25.2%	23.9%	1.09	0.99	50.1%	1.04
结核分枝杆菌	15.1%	34.9%	35.4%	14.6%	1.03	0.99	70.3%	1.00
酵母菌	31.7%	18.3%	17.4%	32.6%	0.97	1.05	35.7%	1.00
牛	29.0%	21.2%	21.2%	28.7%	1.01	1.00	42.4%	1.01
猪	29.8%	20.7%	20.7%	29.1%	1.02	1.00	41.4%	1.01
人	30.4%	19.9%	19.9%	30.1%	1.01	1.00	39.8%	1.01

DNA中的这些碱基定量关系称为Chargaff法则,这一法则揭示了DNA中A与T,G与C的碱基配对规则,该法则是DNA双螺旋模型提出的关键。

8.2.2 DNA二级结构——双螺旋

为了进一步解析DNA的结构，Rosalind Franklin和Maurice Wikins利用X射线衍射方法分析了DNA纤维，得到了一幅很有特征的X射线衍射图(图8.8)。

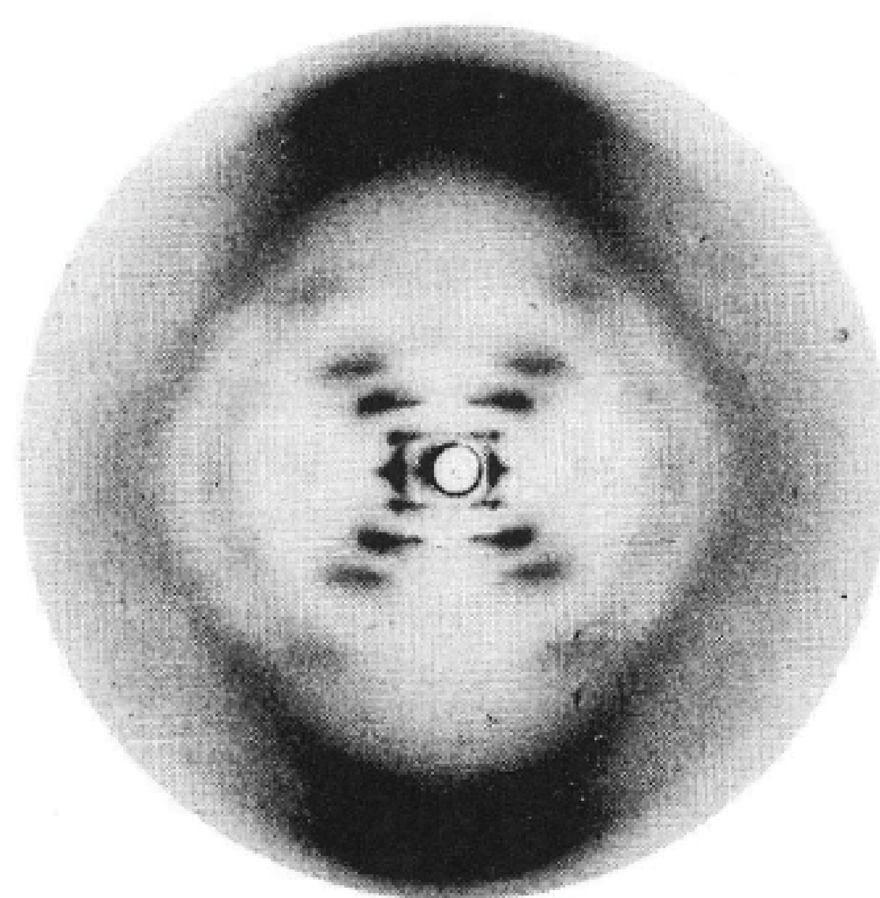


图8.8 垂直方向的DNA晶体X射线衍射照片

X形的中心表示一个螺旋，图上部和下部的黑色弧表示螺旋的重复部分

1953年Watson和Crick根据已知的核苷酸结构和X射线衍射图制作了一个DNA双螺旋模型(图8.9)。这个模型圆满地解释了包括DNA晶体X射线衍射数据和Chargaff法则等有关DNA的所有数据。研究成果以"核酸的分子结构——脱氧核糖核酸的结构"为题的论文于1953年4月25日发表在《自然》杂志。由于在DNA结构解析方面做出了杰出的贡献，Watson、Crick和Wikins获得了1962年诺贝尔生理学及医学奖(此时Franklin已去世)。

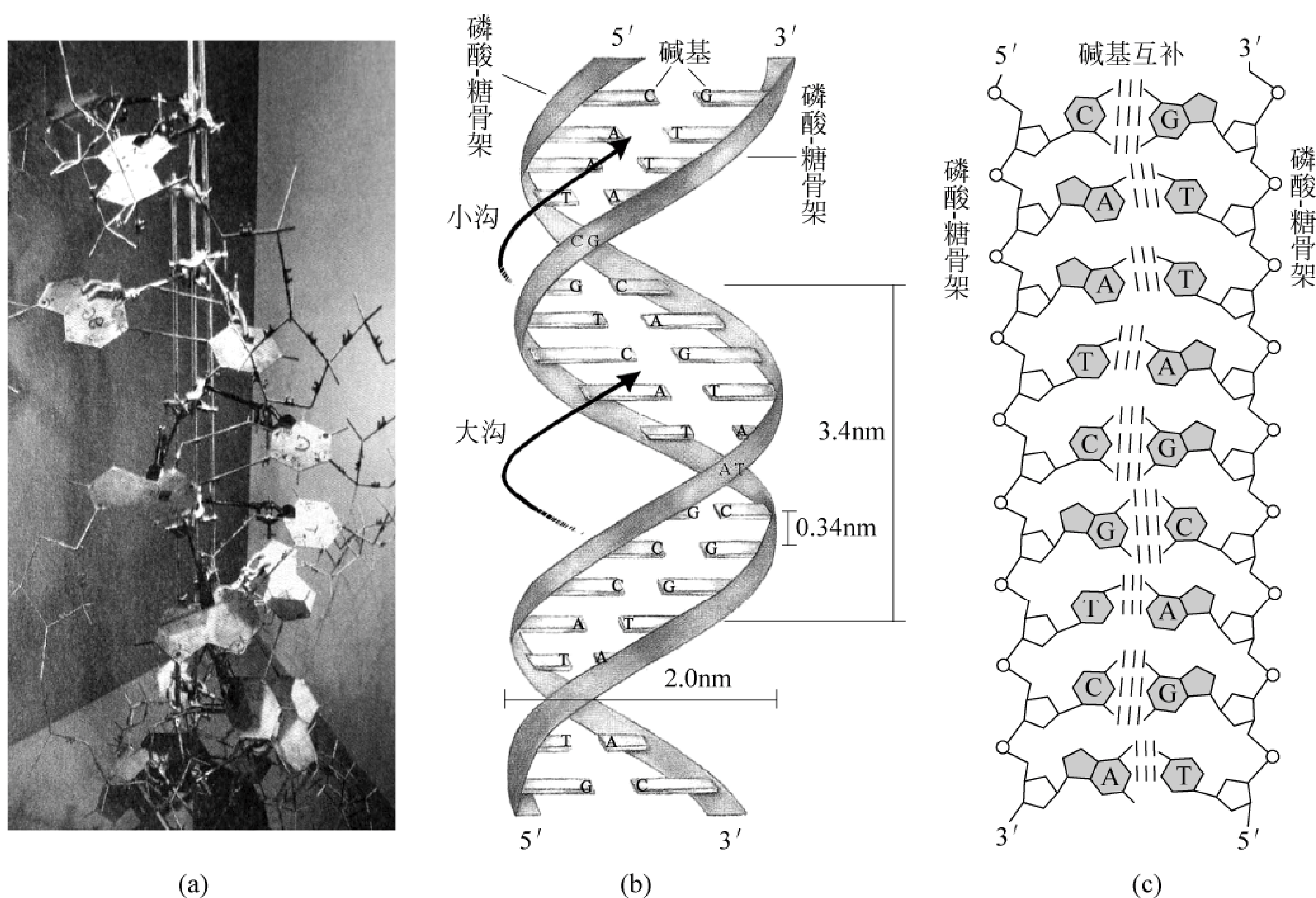


图8.9 DNA双螺旋结构

(a) Watson和Crick制作的双螺旋模型；(b)DNA双螺旋示意图；(c)双螺旋的两条链碱基互补

Watson 和 Crick 提出的双螺旋结构主要有以下一些要点。

(1) DNA 的两条多核苷酸链围绕着同一假想的中心轴形成一个双螺旋。

(2) 两条链反向平行,一条链是 5′→3′方向,另一条链是 3′→5′方向,但每条链都是右手螺旋。

(3) 一条链上的每一个碱基与另一条互补链上的碱基通过氢键形成碱基对,而且每个腺嘌呤必须与胸腺嘧啶配对,反之,胸腺嘧啶也只能与腺嘌呤配对;每个鸟嘌呤只能与胞嘧啶配对,同样,胞嘧啶也只配鸟嘌呤(图 8.10)。

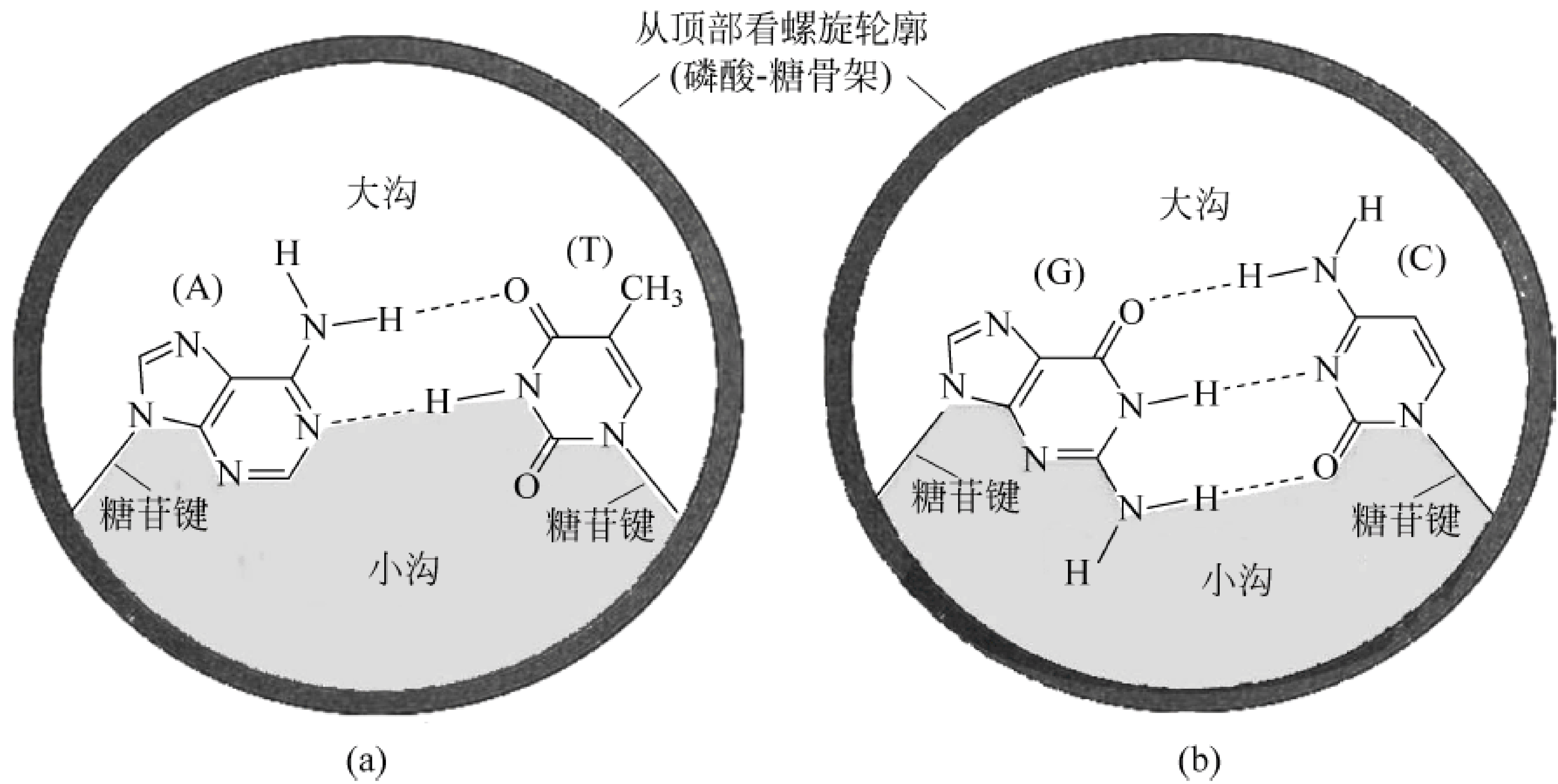


图 8.10 Watson-Crick 碱基对

(a) A-T 碱基对,形成两个氢键;(b) G-C 碱基对,形成 3 个氢键,在双螺旋表面形成了大沟(圆圈内白色区)和小沟(圆圈内阴影区)

(4) 两条链上的碱基堆积在螺旋的内部,磷酸-脱氧核糖链围绕在螺旋外围。在螺旋表面形成了两条深浅不同的沟:大沟和小沟。

(5) 双螺旋的平均直径为 2.0nm,每一圈螺旋含有 10 个碱基对,螺距为 3.4nm,相邻碱基对距离为 0.34nm。

DNA 双螺旋结构由互补碱基之间的氢键和碱基对堆积力(主要为范德华力)两种主要作用力维系。DNA 两条链之间的互补主要由碱基对间氢键维持,而双螺旋稳定性主要靠碱基堆积力维系。埋于双螺旋内的疏水嘌呤和嘧啶碱基的疏水效应也增加了螺旋的稳定性。

另外,电荷-电荷相互作用也是维系双螺旋结构稳定的力。骨架中带负电荷的磷酸基团的静电排斥力可能造成 DNA 双螺旋的不稳定,但由于存在像 Mg^{2+} 那样的阳离子和 DNA 结合蛋白那样的阳离子蛋白(富含碱性残基精氨酸和赖氨酸),这种排斥力可被降至最小。

在双螺旋结构文章发表一个多月之后的 1953 年 5 月 30 日,Watson 和 Crick 又在《自然》杂志上发表了"脱氧核糖核酸结构的遗传学意义"的文章,解释了遗传物质自我复制的机制,解决了一个基本的生物学问题——遗传复制中样板的分子基础。

双螺旋模型最主要特点是两条链之间的互补性,复制之前氢键断裂,双链分离,分开后的每条亲代链作为模板复制出一条新的互补链,合成出各含有一条亲代链和一条子代链的两对 DNA(图 8.11)。Watson 和 Crick 提出的复制机制通过实验得到了证实,使得人们对生物遗传的认识有了革命性的进展。

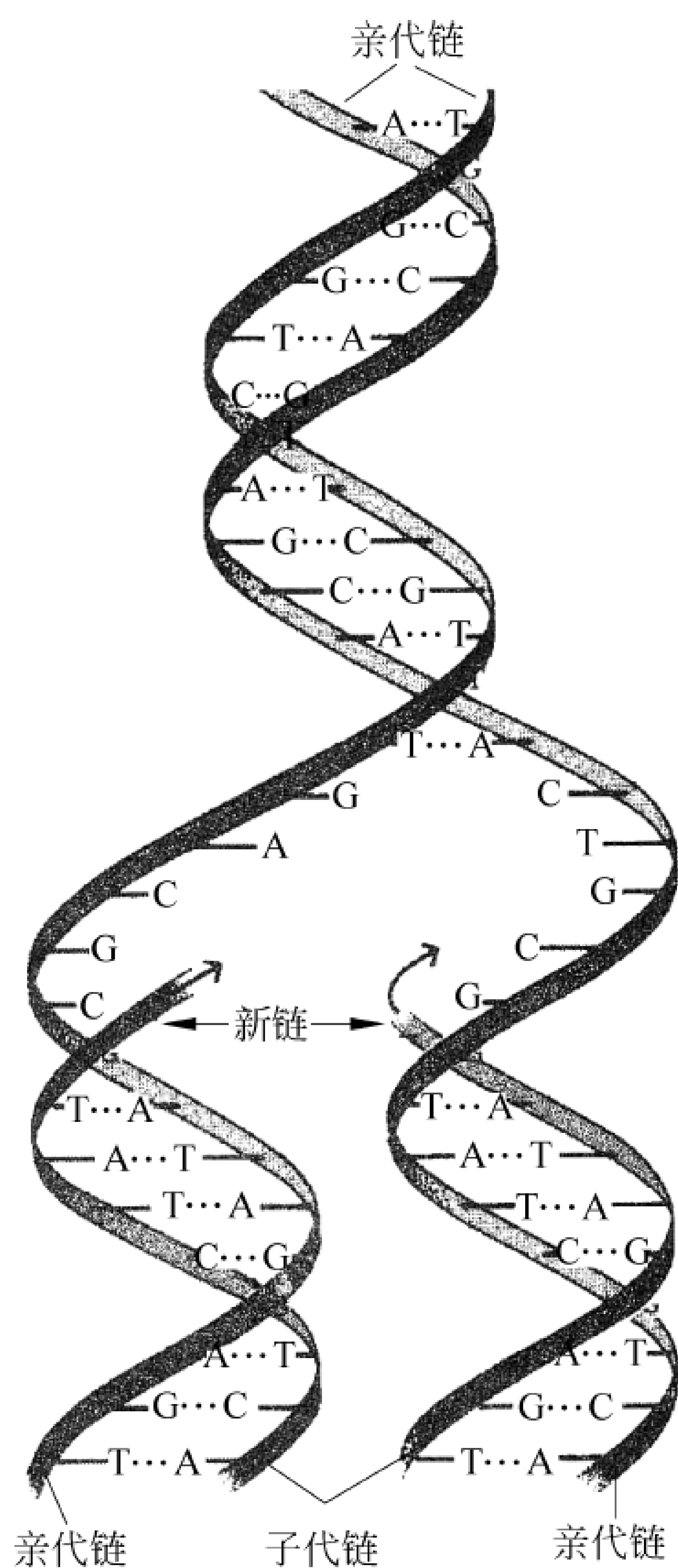


图 8.11 Watson 和 Crick 提出的 DNA 复制机制

亲代链解开，每条链作为模板合成互补的子代链

8.2.3 其他类型 DNA

Watson 和 Crick 的 DNA 双螺旋模型是依据 Franklin 拍摄的 DNA 纤维衍射图提出的，称为 B 型 DNA(B-DNA)，B-DNA 属于生理条件下最稳定的构象。除了 B-DNA 之外，由于结晶的相对湿度和其他条件不同，还存在 A 型和 Z 型 DNA(表 8.3)(图 8.12)。

表 8.3 A-DNA、B-DNA 和 Z-DNA 的主要结构特点

结构特点	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
螺旋方向	右手	右手	左手
每一碱基对旋转角度/(°)	32.7	34.6	30
每一转的碱基对数	约 11	约 10.4	约 12
碱基对相对螺旋轴的倾斜角度/(°)	19	1.2	9
每一碱基对沿螺旋轴上升的距离/nm	0.23	0.33	0.38
螺距/nm	2.46	3.40	4.56
螺旋直径/nm	2.55	2.37	1.84

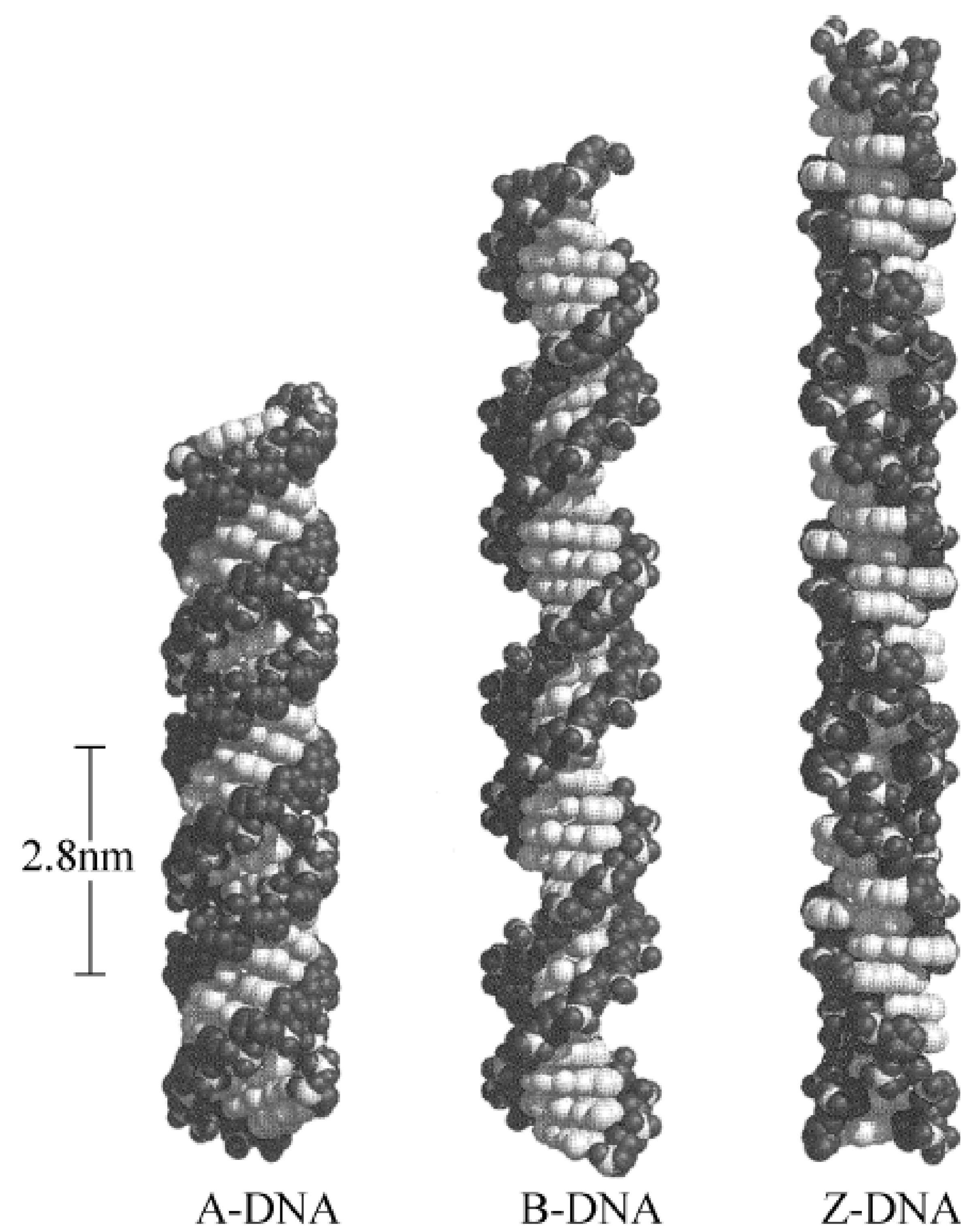


图8.12 A-DNA、B-DNA、Z-DNA双螺旋模型

(来源：Dickerson,R.E,1982)

A-DNA也是右手双螺旋,而Z-DNA是左手双螺旋结构。A-DNA中碱基对所处平面与螺旋中心轴成19°角,使得大沟变深,小沟变浅。每一圈螺旋所含碱基对数为11。Z-DNA是左手双螺旋结构,每一圈螺旋含12个碱基对,Z-DNA没有明显的沟,因为碱基对只稍微偏离螺旋轴。尽管可以人工合成Z-DNA,但在生物体的基因组中很少出现这类DNA。

8.2.4 DNA三级结构——超螺旋

一个具有B构象的环状DNA分子每转含有的碱基对数平均为10.4个,这样的环状DNA称为松弛型DNA。如果环形DNA被切断,变成一个线性双螺旋分子,然后用两手分别捏住两端,同时向右(紧旋)或向左(解旋)方向捻动,将断的链重新连接成环,每转的碱基对数就不再是B构象所要求的10.4个了,可能是大于10.4(过旋)或小于10.4(欠旋)的具有扭转应力的环了。

环状DNA分子为了抵消过旋或欠旋产生的应力,形成了恢复双螺旋每转10.4个碱基对的超螺旋。过旋DNA会自动形成带有额外左手螺旋的超螺旋,称为正超螺旋(positive supercoil);而欠旋形成额外右手螺旋,称为负超螺旋(negative supercoil),负超螺旋也可以通过DNA的局部解旋消除(图8.13)。

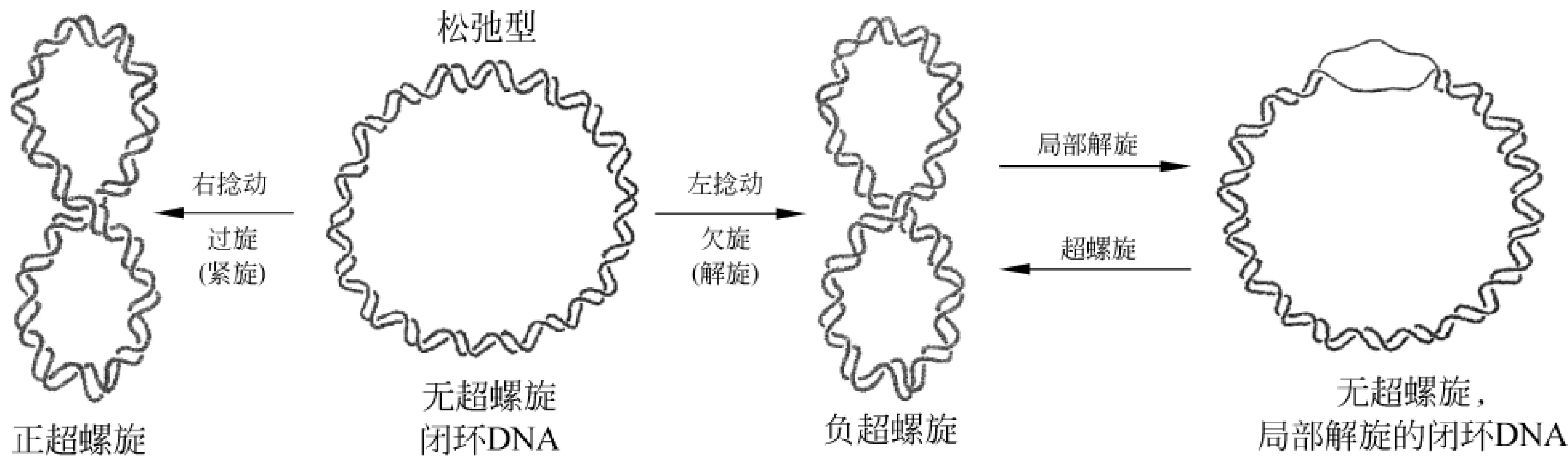


图8.13 超螺旋DNA的形成

细胞内大多数环状 DNA 分子处于超螺旋状态,即使是长的、线状 DNA 分子局部也含有超螺旋区。典型的细菌染色体每 1000 个碱基对就含有 5 个超螺旋,而真核细胞中 DNA 含有的超螺旋更多。所有原核细胞和真核细胞中都含有可以使双螺旋解旋或过旋,以及切断 DNA 的一条或两条链,并再将链连接上而改变 DNA 拓扑特性的酶。这些酶称为拓扑异构酶(topoisomerases),专门担负增加和除去超螺旋任务。

图 8.14 给出了一个拓扑异构酶去除一个负超螺旋的例子。酶首先结合在局部解旋的一条 DNA 链上,切断磷酸二酯键,当另一条链从切口绕出后,再将切口缝合,完成了除去一个超螺旋的操作。

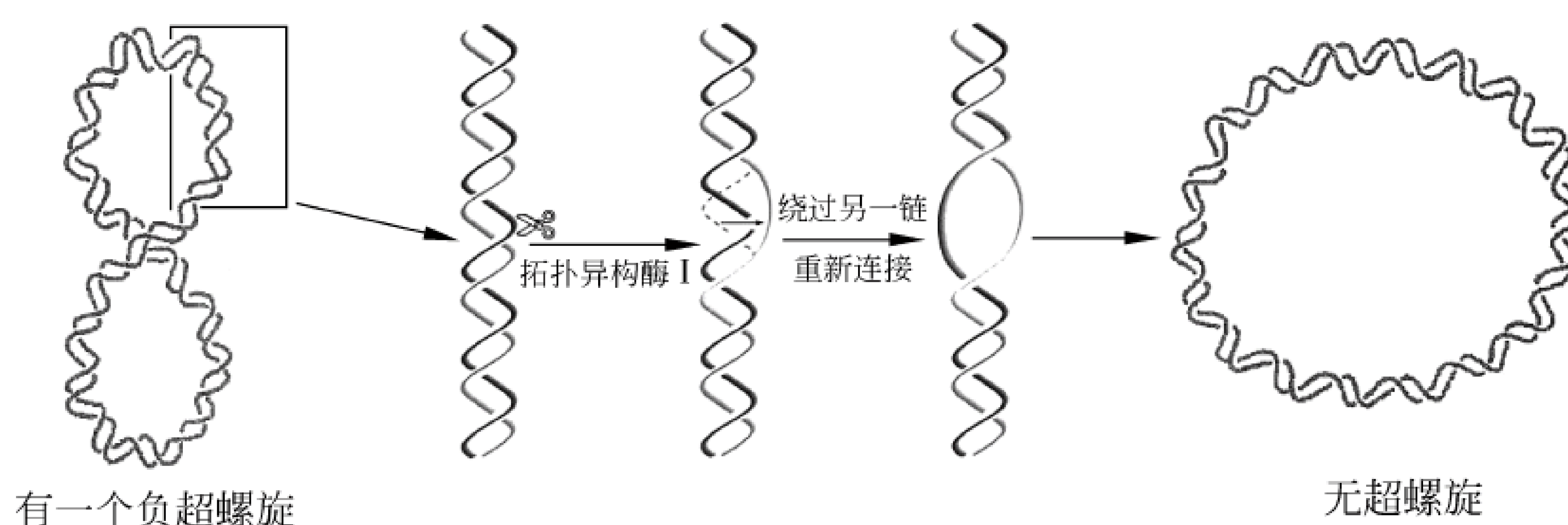


图 8.14 *E. coli* 拓扑异构酶的作用

由于细胞中大多数 DNA 是负超螺旋,与正超螺旋相比,将一段负超螺旋解旋是比较容易的,特别是那些富含 A-T(两个氢键)的区域。局部解旋在 DNA 复制、重组、修复和转录的起始阶段是一个必不可少的步骤。

8.3 核小体和染色质

在 Miescher 发现核质(nuclein)10 年后,即 1879 年 Walter Flemming 通过显微镜观察到染色的真核细胞核内存在着"珠"状物质,他把这种物质称为染色质(chromatin,来自希腊语 chroma,意思是有颜色)。现在染色质特指真核细胞核内的 DNA 与蛋白质的复合物。

人细胞核中含有 46 条这样的染色质纤维,或称为染色体(chromosome)。平均每个染色体含有 1.3×10^8 碱基对,以 B 构象(螺距 3.4nm)伸展开的话,一个染色体 DNA 分子长 5cm,46 个双链 DNA 分子总长在 2m 以上。2m 多长的分子是如何被包装在直径 5μm 的细胞核内的呢?以长度约为 8.2cm(含 2.4×10^8 碱基对)的最大染色体为例,在细胞分裂中期,实际观察到的长度为 10μm 左右,约是以 B 构象伸展开长度的 1/8000,被压缩了 8000 倍。DNA 分子是怎样被压缩的呢?

当染色质用低离子强度的溶液处理后,电子显微镜照片像是一条绳上穿了许多"珠"子的"念珠"。"念珠"是称为核小体(nucleosome)的 DNA-组蛋白复合体相互连接形成的,其中的 DNA 是双螺旋 DNA,而组蛋白是由各两分子的组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 组成的 8 聚体蛋白。约 200 个 DNA 碱基对缠绕在组蛋白核的外面,缠绕约 1.75 圈,有 146 个 DNA 的碱基对处于与组蛋白核紧密结合的状态,形成一个核小体核心颗粒。核心颗粒之间的"绳"称为连接 DNA,约有 54 个碱基对长。组蛋白 H1 既与连接 DNA 结合,又和核小体核心颗粒结合,核小体是染色质包装的基本单位(图 8.15)。

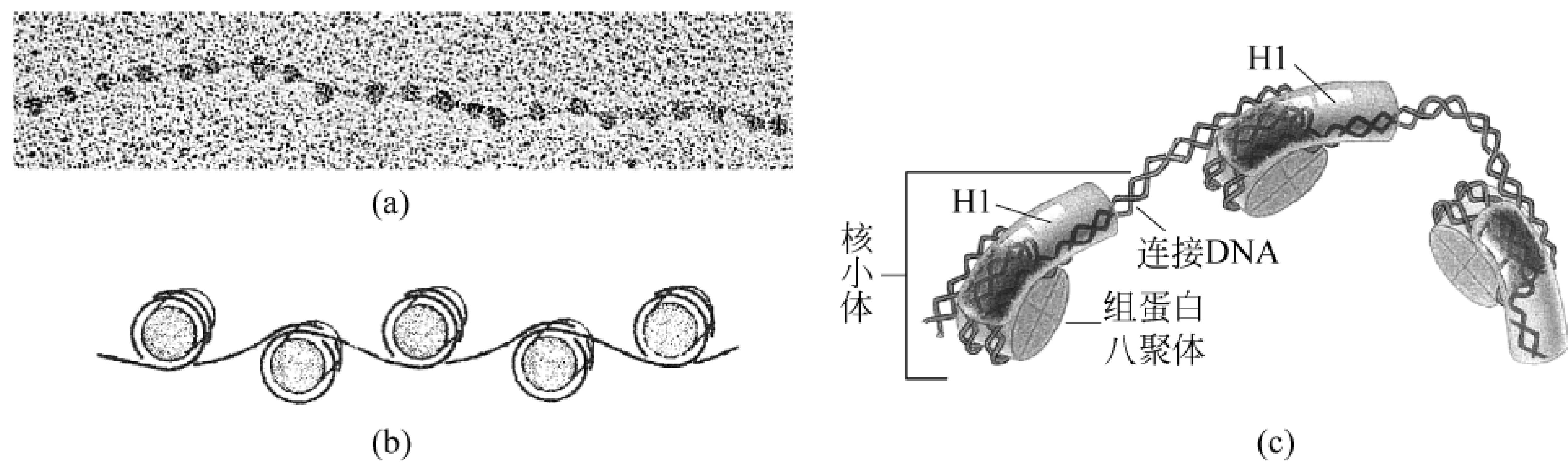


图 8.15　核小体结构

(a) 染色质的绳——珠串电镜照片；(b) 染色质的绳——珠结构示意图；(c) 核小体结构

图 8.16(a)～(f)给出了从 DNA 双螺旋开始逐级压缩包装的过程。

(a) DNA 双螺旋。

(b) 直径 2nm 的 DNA 双螺旋绕组蛋白八聚体约 2 圈，形成直径 10nm 的核小体，每个核小体含 160bp(每圈约 80bp)。与伸展的 B-DNA 长度相比，包装成核小体后，DNA 长度被压缩了 6～7 倍。

(c) 这些核小体按照每圈 6 个核小体方式缠绕成螺线管，再进一步形成直径 30nm 纤丝。

(d) 30nm 的纤丝形成长的 DNA 突环，附着在核基质上，每个环约含 60 000bp。

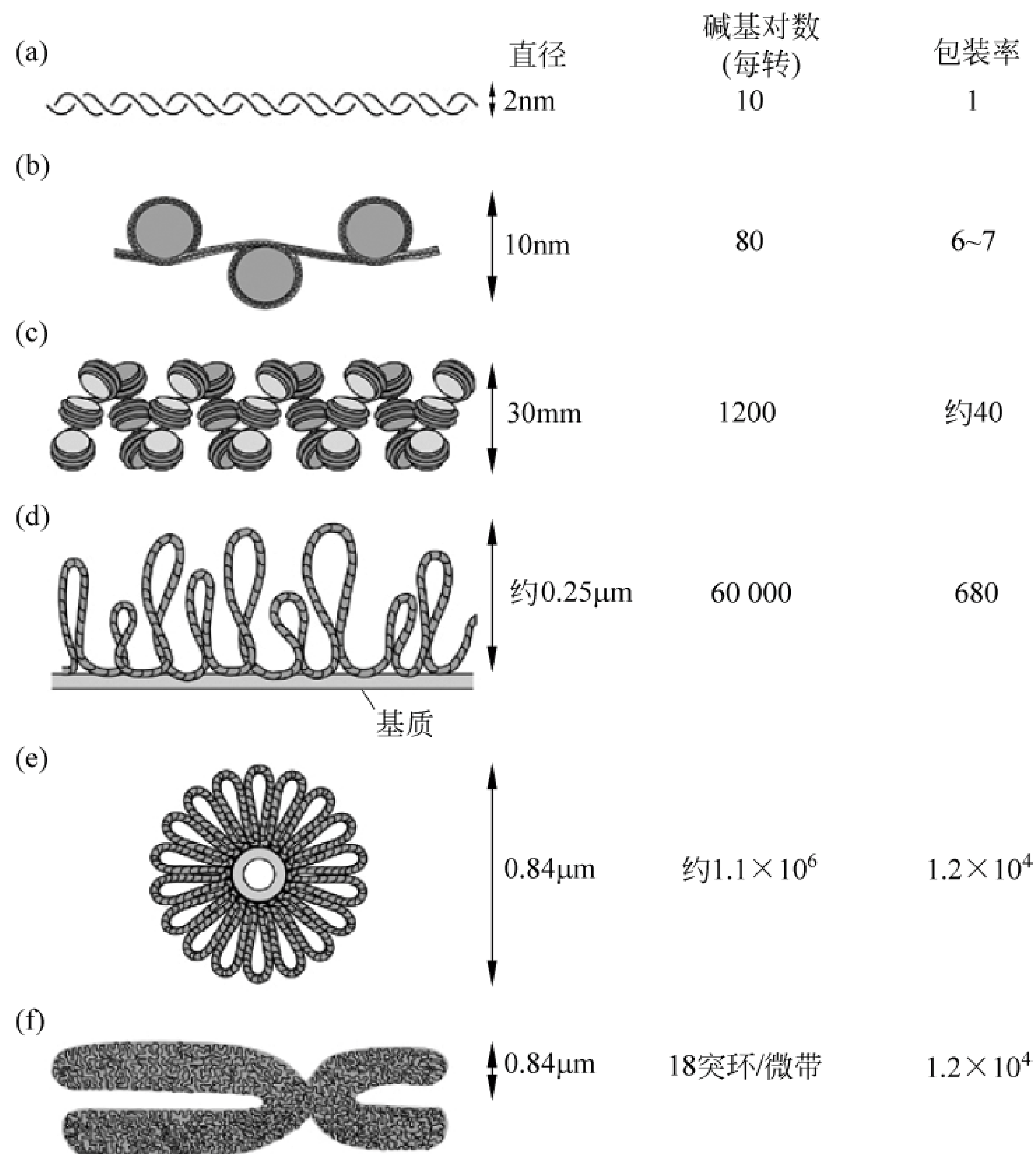


图 8.16　染色体 DNA 不同层次包装示意图

(a) DNA 双螺旋；(b) 形成核小体；(c) 形成螺线管；(d) 形成 DNA 突环；(e) 形成微带；(f) 包装成人 4 号染色体

(e) 18 个突环放射状地缠绕一周形成染色体的微带单位。

(f) 处在有丝分裂的人 4 号染色体的每个染色质由约 10^6 这样的微带形成。

原核生物中没有组蛋白,但原核生物 DNA 的包装也与蛋白质有关。HU 蛋白是细菌中一种丰富的蛋白,它可以结合 DNA,形成像核小体那样的结构,还有类似于组蛋白的 H-NS 蛋白也参与 DNA 的包装。

8.4 双链 DNA 的变性与复性

在生理条件下从热力学上看双螺旋 DNA 要比分开的单链稳定得多,因此体内存在的 DNA 主要是双螺旋形。然而,在 DNA 复制、修复、重组和转录时会通过解旋破坏局部双螺旋结构,完全解旋和分离成两条单链称为变性,但变性只会发生在体外。

在体外,通过加热或像尿素和盐酸胍那样的离液剂可以使双链 DNA 变性。在研究 DNA 热变性时,通常都是慢慢地升高 DNA 溶液的温度,随着温度的升高,越来越多的碱基对之间的氢键被破坏,碱基对被拆开,最终双链完全分开。人们将 1/2 DNA 变成了单链时的温度称为熔点(T_m)。

利用紫外光在接近核酸最大吸收的 260nm 波长可以测量 DNA 变性的程度。在 260nm 波长处单链 DNA 的光吸收要比双链 DNA 高 12%~40%,这是因为双链 DNA 中堆积的碱基对之间相互作用降低了吸收(图 8.17)。等量的游离核苷酸的紫外吸收比单链 DNA 的吸收还要强,说明单链 DNA 还维持着某些堆积的相互作用。由于核酸变性而引起紫外吸收增加的现象,称为增色效应。

DNA 溶液吸收对温度变化的曲线称为融解曲线(图 8.18)。在熔点处吸收陡增,由双螺旋到单链 DNA 的过渡发生在很窄的温度范围内。从图 8.19 看到聚(GC)双链变性温度要比聚(AT)双链高得多,T_m 值也就越高。显然富含 AT 的 DNA 要比富含 GC 的 DNA 更容易融解,因为 A 与 T 之间只形成 2 个氢键,而 G 与 C 之间有 3 个氢键。

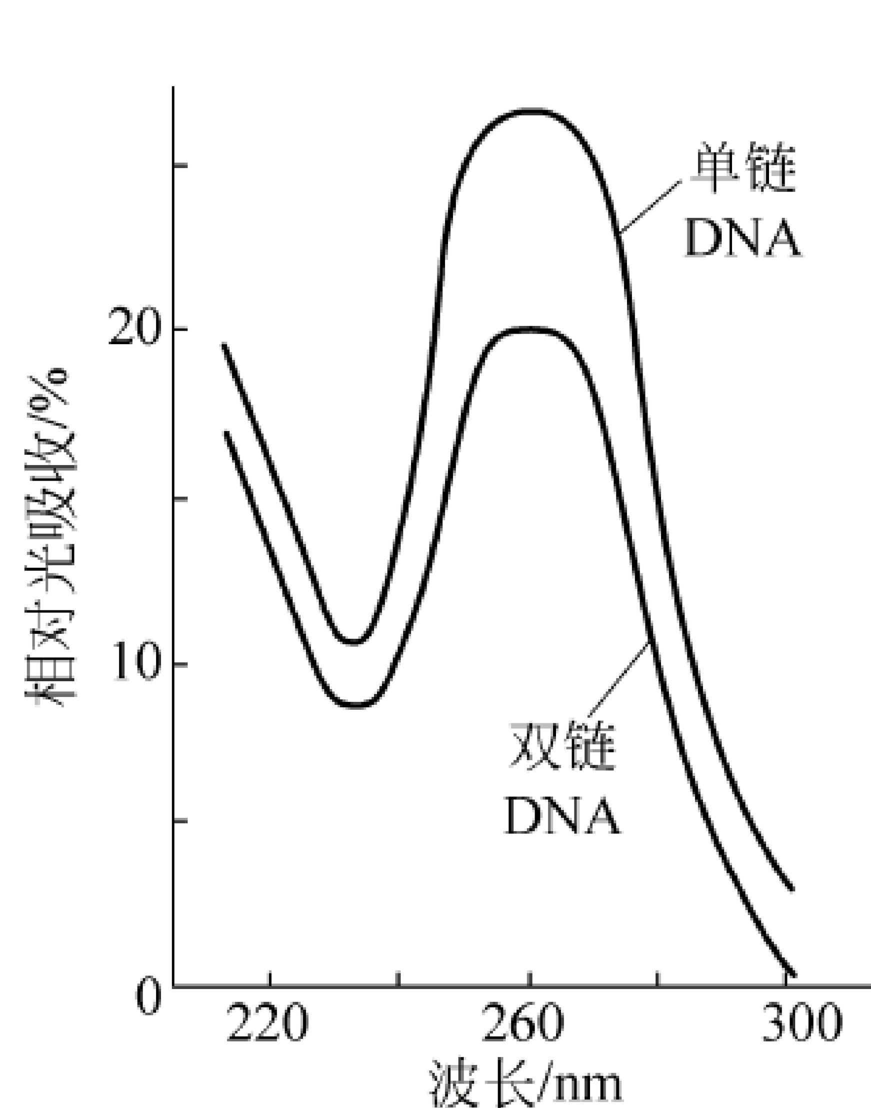


图 8.17 双链和单链 DNA 的吸收光谱

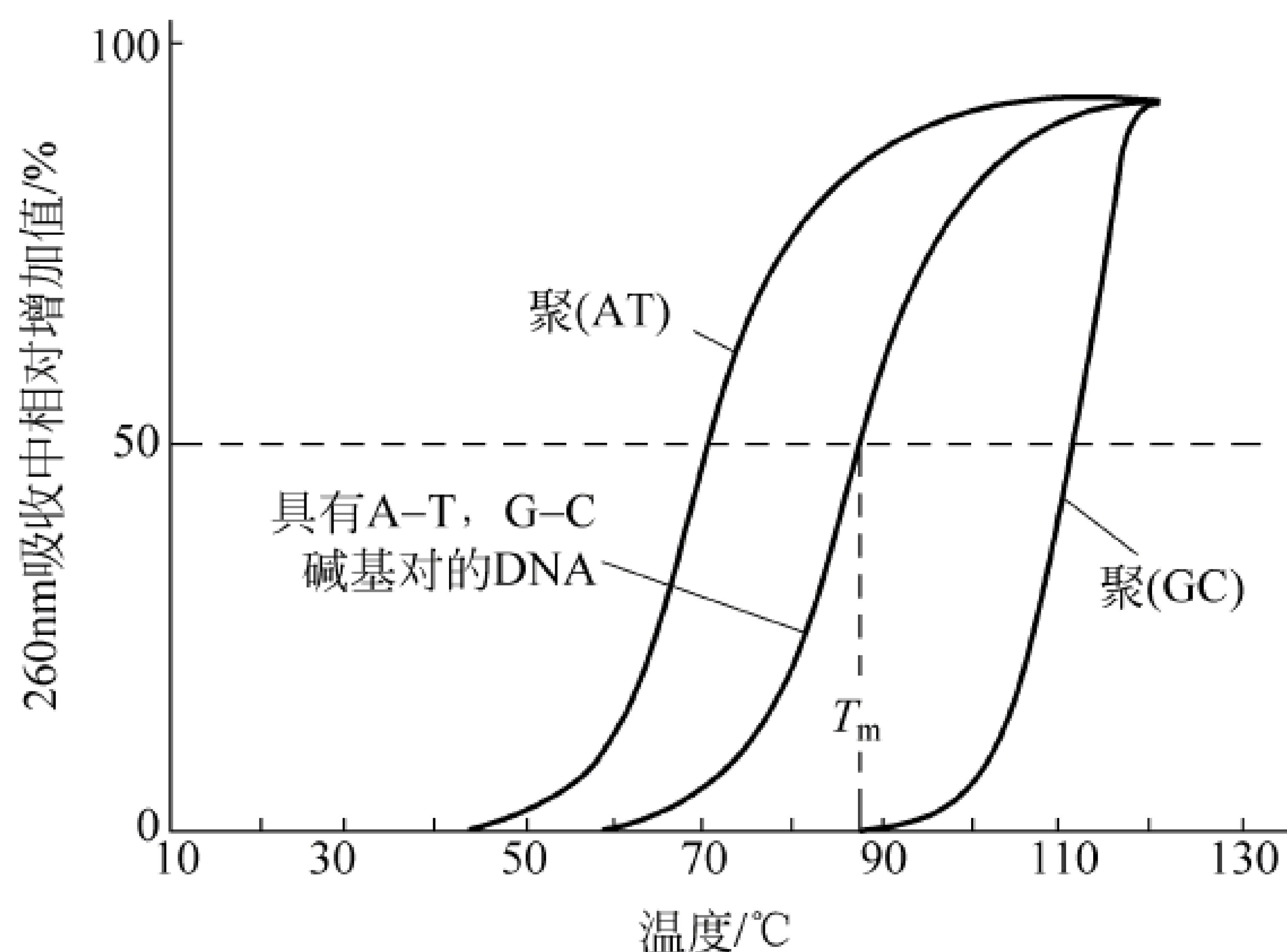


图 8.18 DNA 的融解曲线

S 形融解曲线表明变性是一个协同过程,就像在蛋白质变性时所看到的那样。这种协同性源于许多堆积相互作用和氢键被破坏时双链的快速解链(去紧扣)。双螺旋去紧扣首先

发生在富含A-T碱基对区,形成一个“泡”。随着温度继续升高,“泡”同时向两个方向扩大,直至双链完全分开。当将温度降低到 T_m 值以下(“退火”过程),变性的DNA可以复性,重新形成双螺旋DNA(图8.19)。核酸复性时,紫外吸收降低,由于复性而引起紫外吸收降低的现象,称为减色效应。

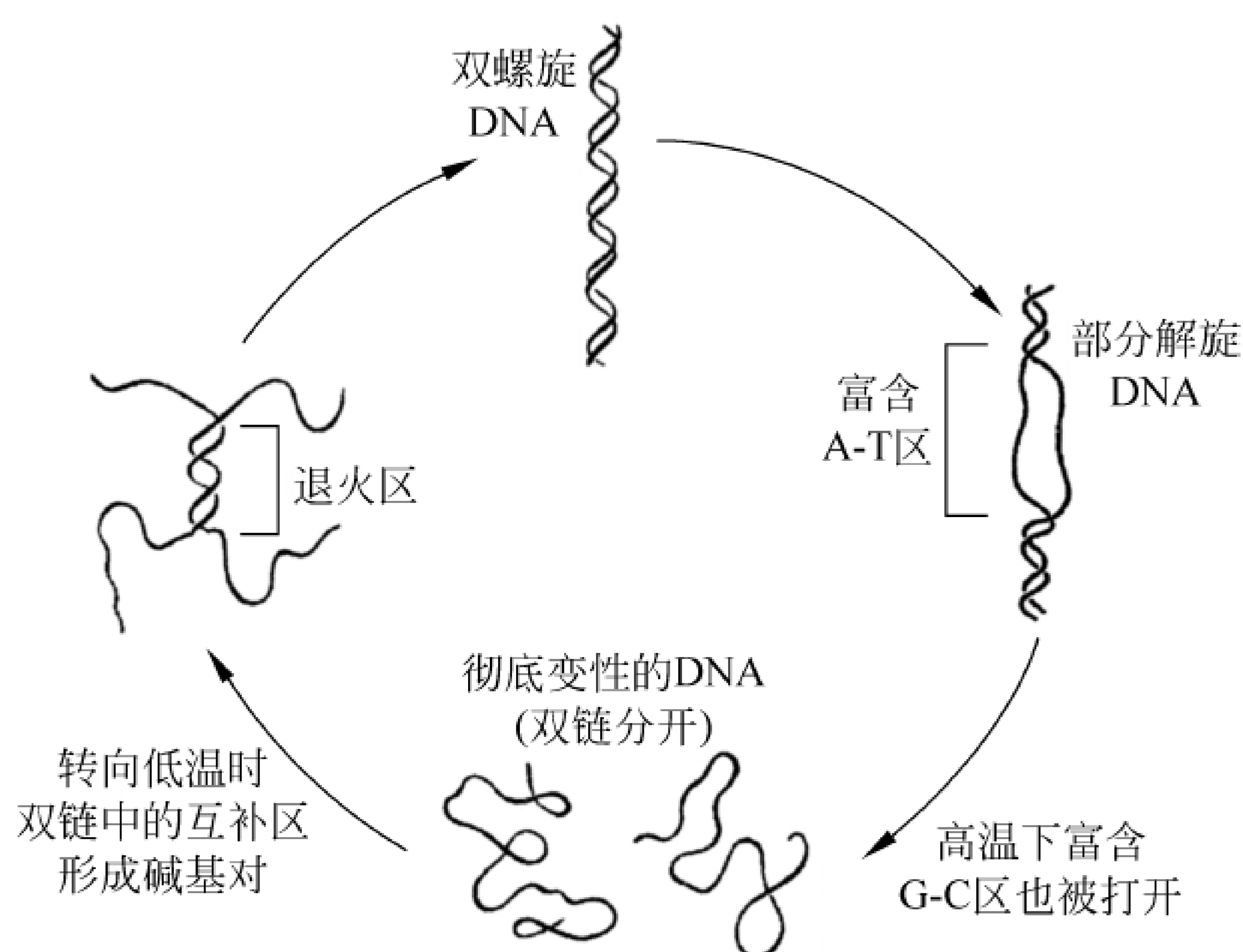


图8.19　DNA的变性与复性

两个不同来源的DNA在变性后的复性过程中,除了形成原有的两个DNA双链外,两个DNA之间还有可能形成杂交体。而且DNA与RNA之间只要存在互补碱基对,也能形成杂交的双螺旋DNA-RNA。

8.5　RNA

DNA分子是生物体的遗传信息库,而RNA分子参与遗传信息表达。在所有细胞内,都存在着以下4种主要类型的RNA,有关它们的结构和功能将在蛋白质合成一章详细描述。

1. 核糖体RNA(ribosomal RNA,rRNA)

rRNA是核糖体整体的一部分,核糖体也称为细胞内核糖核蛋白,是蛋白质合成的场所。rRNA是细胞内最丰富的一类RNA,约占细胞总RNA的80%。

2. 转移RNA(transfer RNA,tRNA)

tRNA分子是氨基酸的载体。在蛋白质合成过程中,tRNA携带激活的氨基酸到核糖体,并将其整合到生长着的肽链上。tRNA长度仅有73～95个核苷酸残基。tRNA约占细胞总RNA的15%。

3. 信使RNA(messenger RNA,mRNA)

mRNA编码蛋白质的氨基酸序列,mRNA作为一个“信使”载有来自DNA的信息,然后进入蛋白质合成场所——核糖体,作为蛋白质合成的模板指导蛋白质的合成。mRNA是细胞内最不稳定的一类RNA,约占细胞总RNA的3%。

4. 小分子RNA

小分子RNA遍布于所有的细胞中,其中的一些RNA具有催化活性,或是与蛋白质一

同起着催化作用,说明这些 RNA 具有酶的功能。许多小分子 RNA 都参与 RNA 合成后的修饰、加工过程,还有一些小分子 RNA 参与基因表达的调控。

RNA 是单链分子,但常常还具有复杂的二级结构。在生理条件下,大多数单链多核苷酸可自身发生回折,按照 A-U、G-C 配对原则形成发卡或茎-环结构。茎由碱基互补的反向平行的两条核苷酸链组成,形成类似于 A-DNA 结构的局部双螺旋 RNA。而环由非互补的核苷酸组成。茎-环结构是 rRNA、tRNA 和小分子 RNA 的共有特征(图 8.20)。

图 8.20　RNA 中的茎-环结构

8.6　核酸水解

大多数核酸都可以被酸、碱和酶水解,水解反应都是切断聚核苷酸骨架中的磷酸二酯键。本节主要介绍核酸的碱水解和酶催化水解反应。

8.6.1　RNA 的碱水解

RNA 中核糖和 DNA 中脱氧核糖之间只是 2′位有无羟基的差别,看起来似乎不太重要,但这一差别却对核酸的特性影响极大。因为核糖的这个 2′位羟基在某些 RNA 分子中可以形成氢键并参与一些化学和酶催化的反应。

碱溶液对 RNA 和 DNA 的作用最能说明有无 2′位羟基而导致化学反应性上的差异。当在室温下用 0.1mol 碱溶液(例如 0.1mol 氢氧化钠)处理 RNA 时,RNA 水解是随机的,最终降解生成 2′-核苷一磷酸和 3-′核苷一磷酸混合物。然而,DNA 在同样条件下却很稳定,说明 RNA 的碱水解需要 2′羟基(图 8.21)。

8.6.2　核酸酶

催化核酸中磷酸二酯键水解的酶统称为核酸酶(nuclease)。细胞内存在着许多种核酸酶,有些核酸酶是 DNA 合成和修复所需要的,而另一些则是用于细胞内 RNA 合成和降解。核糖核酸酶(ribonucleases,RNases)只作用于 RNA,而脱氧核糖核酸酶(deoxyribonucleases,DNases)只作用于 DNA。但有些核酸酶既催化 RNA 水解,也催化 DNA 水解。

根据酶作用部位不同,核酸酶分为外切核酸酶(exonuclease)和内切核酸酶(endonuclease)。外切核酸酶从多核苷酸链的末端水解磷酸二酯键后,释放出末端核苷酸残基;而内切核酸酶可以在多核苷酸链内的不同位置水解 3′,5′-磷酸二酯键,既可以在 3′酯键处(图 8.22 中 A 处),也可以在 5′酯键处切断磷酸二酯键(图 8.22 中 B 处)。

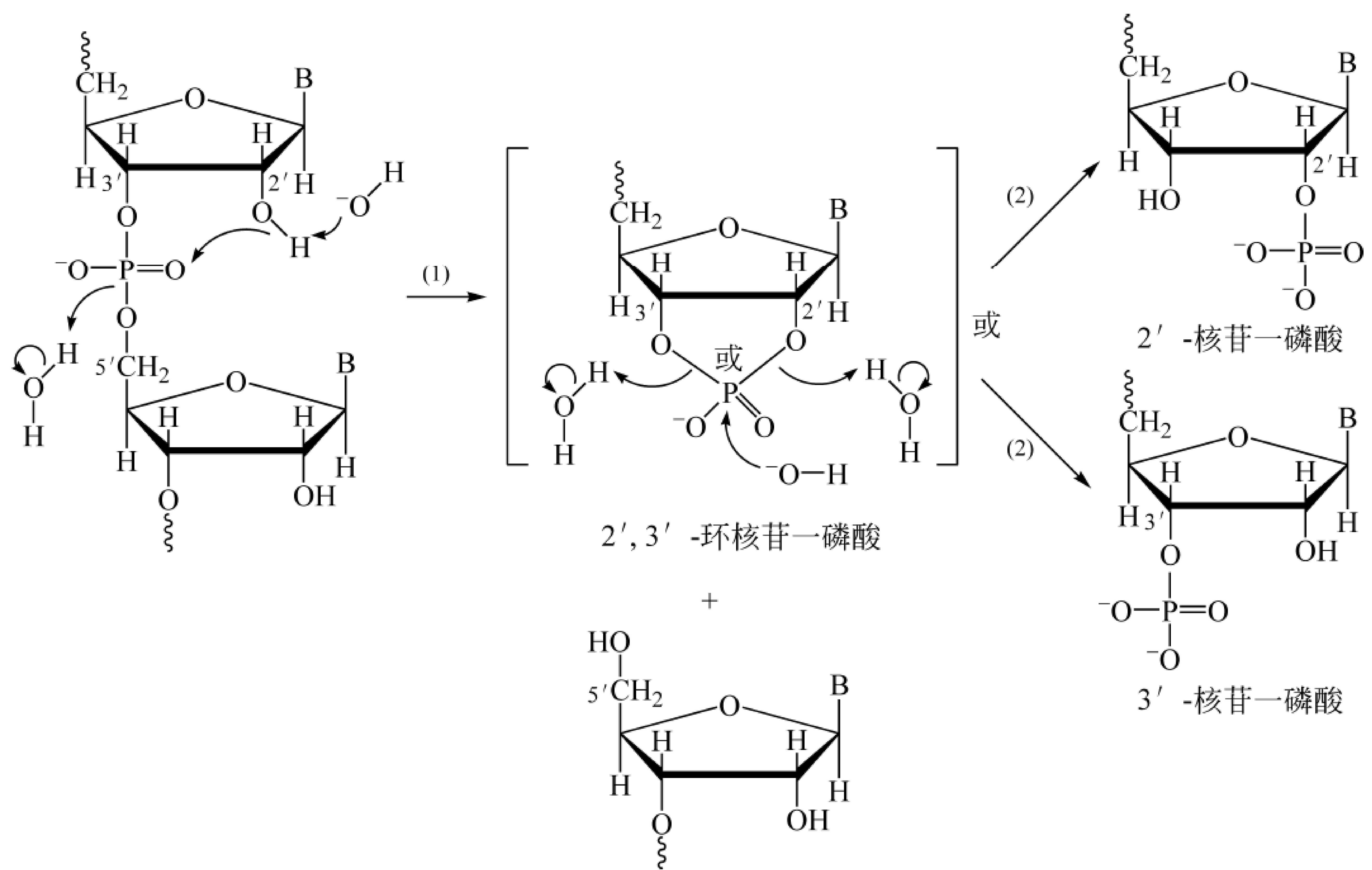


图 8.21　RNA 的碱水解

B 代表嘧啶或嘌呤碱基

(1) 生成 2′,3′-环核苷一磷酸；(2) 生成 2′-或 3′-核苷一磷酸

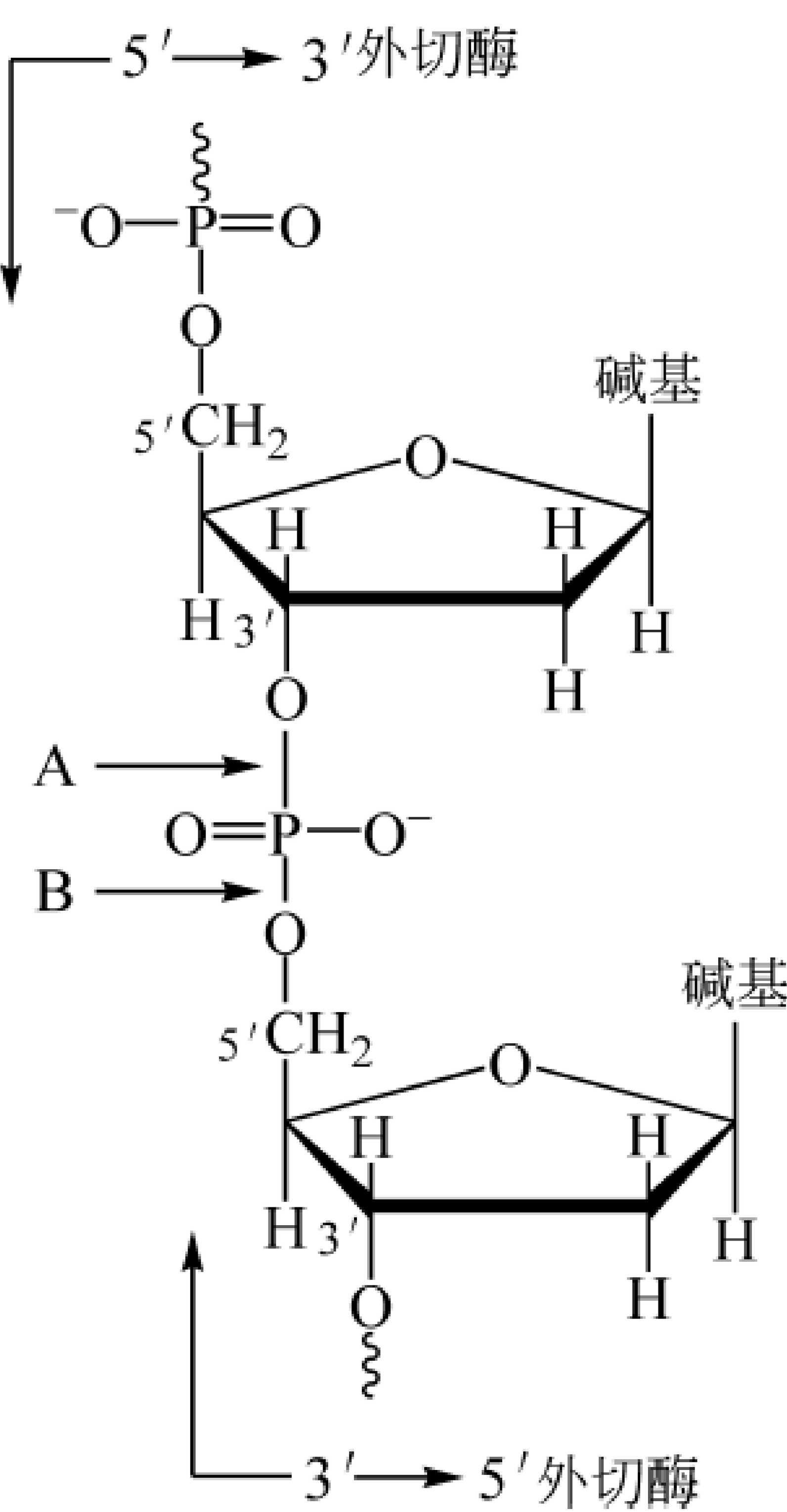


图 8.22　核酸酶酶切位置

在 A 点切可形成一个带有 3′羟基的片段和带有游离 5′-磷酸的片段,在 B 点切可形成一个带有游离 3′-磷酸的片段和带有 5′羟基的片段

表 8.4 列出了一些常用的、来自不同生物的核酸酶及它们作用的底物和生成的产物。

表 8.4 一些有代表性的核酸酶

酶 名 称	底 物	产 物
外切核酸酶(3′→5′)(exonucleases)		
外切核酸酶Ⅰ(*E. coli*)	单链 DNA	核苷 5′-磷酸
DNA 聚合酶Ⅰ(*E. coli*)	单链 DNA	核苷 5′-磷酸
外切核酸酶Ⅲ(*E. coli*)	单链 DNA	核苷 5′-磷酸
枯草芽孢杆菌外切核酸酶	双链 DNA,RNA	核苷 3′-磷酸、寡核苷酸
外切核酸酶(5′→3′)(exonucleases)		
枯草芽孢杆菌外切核酸酶	单链 DNA	核苷 3′-磷酸(也可从 3′端切)
外切核酸酶Ⅶ(*E. coli*)	单链 DNA	寡核苷酸(也可从 3′端切)
粗糙脉孢菌外切核酸酶	单链 DNA,RNA	核苷 5′-磷酸
外切核酸酸Ⅵ或 DNA 聚合酶Ⅰ(*E. coli*)	双链 DNA	核苷 5′-磷酸
内切核酸酶(endonucleases)		
粗糙脉孢菌内切核酸酶	单链 DNA,RNA	带有 5′-磷酸末端的多核苷酸
内切酶Ⅰ(*E. coli*)	单链或双链 DNA	带有 5′-磷酸末端的多核苷酸
DNA 酶Ⅰ(牛胰腺)	单链或双链 DNA	带有 5′-磷酸末端的多核苷酸
DNA 酶Ⅱ(小牛胸腺)	单链或双链 DNA	带有 3′-磷酸末端的多核苷酸
RNA 酶 A(牛胰腺)	RNA	带有 3′-磷酸末端的多核苷酸

8.6.3 限制酶

限制性内切核酸酶(restriction endonucleases)是一类作用于 DNA 的内切核酸酶,也称为限制性内切酶,常简称为限制酶。限制酶名称源于某些细菌通过这种核酸酶破坏入侵的噬菌体(病毒)DNA,阻止噬菌体感染,限制外源 DNA 在细菌内表达。这些限制酶能够识别和结合特殊的 DNA 序列,并在结合位点切断 DNA 的双链,生成能够被其快速降解的片段。

当然宿主细胞也要保护自身 DNA 免于被限制酶切割,为此宿主将 DNA 中可能被限制酶识别和结合的某些碱基都进行修饰。通常是通过甲基化酶将识别序列内的腺嘌呤和胞嘧啶甲基化,防止宿主 DNA 被限制酶切割。

现在发现的限制酶都来自于细菌,主要分为Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ 3 种类型,Ⅰ型和Ⅲ型具有内切酶和甲基化酶活性,这两种类型限制酶识别部位和酶切部位是分开的,而且反应时需要 ATP。而Ⅱ型限制酶识别和酶切序列是同一部位,反应不需要 ATP,这里着重介绍Ⅱ型限制酶。

表 8.5 列出了一些有代表性的Ⅱ型限制酶识别和酶切的特殊序列。限制酶作用序列是由 4～8 个碱基对组成的特殊的回文(palindrome)序列(回文,如英文单词 level,正读和反读是一样的意思),两条链上 5′→3′方向序列是一样的。

表 8.5　Ⅱ型限制酶识别与酶切序列

酶	识别、切割部分	酶切后产物
*Bam*HI	↓ 5′-GGATCC-3′ 3′-CCTAGG-5′ ↑	5′-G　　　＋　　GATCC-3′ 3′-CCTAG　　　　　　G-5′
*Eco*RI	↓ 5′-GAATTC-3′ 3′-CTTAAG-5′ ↑	5′-G　　　＋　　AATTC-3′ 3′-CTTAA　　　　　　G-5′
*Hae*Ⅲ	↓ 5′-GGCC-3′ 3′-CCGG-5′ ↑	5′-GG　　　＋　　CC-3′ 3′-CC　　　　　　GG-5′
*Hind*Ⅲ	↓ 5′-AAGCTT-3′ 3′-TTCGAA-5′ ↑	5′-A　　　＋　　AGCTT-3′ 3′-TTCGA　　　　　　A-5′
*Hpa*Ⅱ	↓ 5′-CCGG-3′ 3′-GGCC-5′ ↑	5′-C　　　＋　　CGG-3′ 3′-GGC　　　　　　C-5′
*Not*I	↓ 5′-GCGGCCGC-3′ 3′-CGCCGGCG-5′ ↑	5′-GC　　　＋　　GGCCGC-3′ 3′-CGCCGG　　　　　　CG-5′
*Pst*I	↓ 5′-CTGCAG-3′ 3′-GACGTC-5′ ↑	5′-CTGCA　　　＋　　G-3′ 3′-G　　　　　　ACGTC-5′

1. 箭头表示限制酶切割的磷酸二酯键位置。
2. 限制酶命名，如 *Eco*RI，由3字母缩写的细菌名称 *Eco*[*Escherichia coli*(大肠杆菌)]、R(菌株)和 I(酶编号)组成。

从表8.5中看到一些限制酶(如 *Eco*RI，*Bam*HI 和 *Hind*Ⅲ)识别和酶切回文序列后，在双链 DNA 上形成切口错开的两个末端，两端都留下2～4个未配对的核苷酸残基，这样的末端称为黏性末端(sticky end)，显然这样的两个末端可以相互配对或与其他 DNA 片段的互补核苷酸序列配对。也有些限制酶(如 *Hae*Ⅲ 和 *Sma*I)在识别的特殊序列的上下相对的磷脂键处切，产物末端没有单链延伸的平末端(blunt end)。

8.6.4　限制酶的应用

早在1978年诺贝尔奖颁给 Werner Arbor、Daniel Nathans 和 Hamilton Smith 前40多年，人们就已经发现了限制酶。第一次纯化的酶就被快速地用作实验室的工具来制造 DNA

了。归纳起来限制酶的应用主要有以下几个方面。

1. 限制酶切图谱

限制酶最早应用是制作显示酶切特异位点的 DNA 限制酶切图谱(restriction map)。这样的限制酶切图谱可用于鉴定含有特殊基因的 DNA 片段。

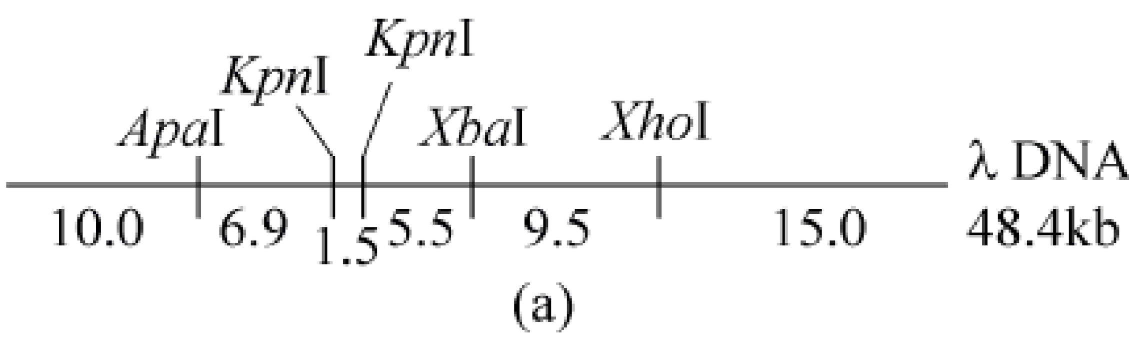
图 8.23 给出了 λ 噬菌体限制酶切图谱的例子。λ 噬菌体 DNA 是长约 48 400bp(48.4kb)的线型双链分子。λ 噬菌体 DNA 溶液用限制酶处理,然后进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶上按照大小排列着酶处理分离的片段。

限制酶图谱现在已被应用到包括亲权鉴定、诊断医学、刑事诉讼和人类基因组测序等领域。

2. DNA 指纹

绘制限制酶切位点的技术是 20 世纪 70 年代发展起来的。不久就成了鉴定人类基因组中突变或变异的常规手段了。例如,就人类来说,高变异的基因组区给出像指纹那样惟一的限制酶切片段。这样的 DNA 指纹可用于亲权鉴定或犯罪调查来鉴定或排除嫌疑。

图 8.24DNA 指纹应用于一个强奸案的例子。从受害者、证据(精液)及两个嫌疑人分离到的 DNA 用限制酶降解,得到的片段进行琼脂糖凝胶电泳。电泳后将凝胶上 DNA 转移到尼龙膜上。结合在膜上的 DNA 经变性后暴露于放射性标记的小 DNA 片段,该片段来自人不同基因组的易变区。标记的 DNA 探针会特异地与尼龙膜上的限制片段杂交,再通过放射自显影鉴定标记的片段。



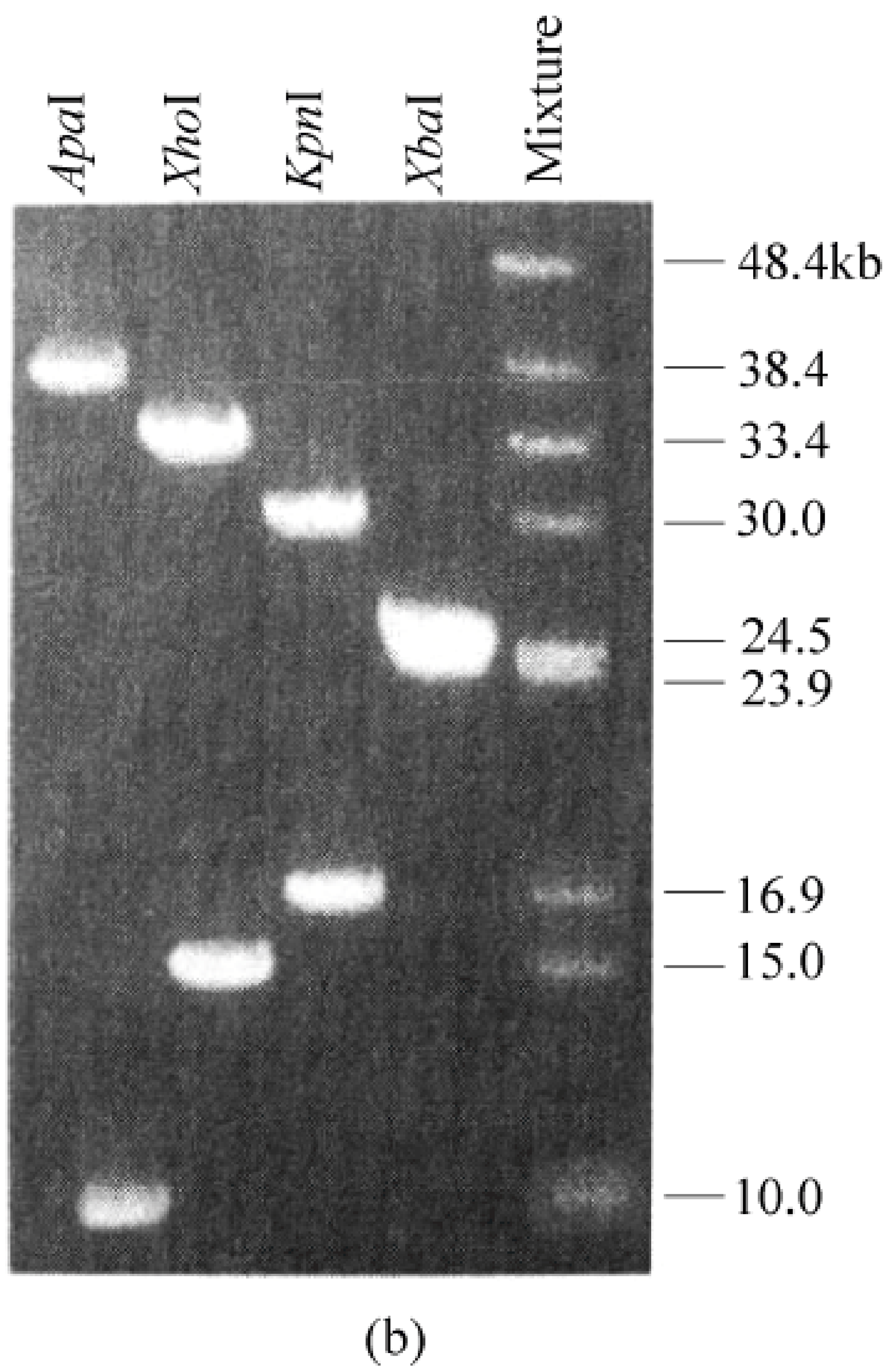


图 8.23 λ 噬菌体的限制酶图谱

(a) 显示酶切位点的限制酶图谱;(b) λ 噬菌体 DNA 经几种限制酶降解后电泳图

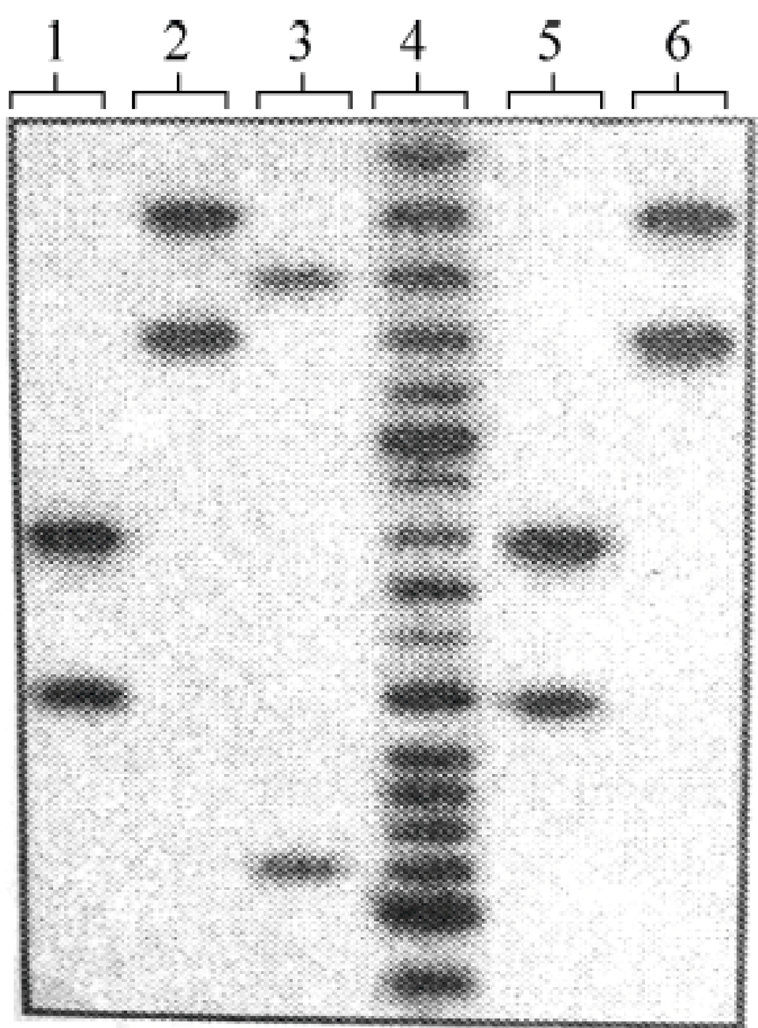


图 8.24 DNA 指纹电泳图

1—受害者(血样);2—嫌疑人 A(血样);3—嫌疑人 B(血样);4—DNA 大小标准;5—证据(女性部分);6—证据(男性部分)

通过鉴定确认嫌疑人A为强奸犯。在实际的犯罪调查中,许多不同的探针与不同的限制酶酶切组合用,为的是确保检测的图谱是惟一的。现代技术强大到足以精确排除嫌疑人,确认罪犯的程度。当与可扩增DNA的聚合酶链反应(PCR)技术结合后,就可以从一个毛囊、一块极小血斑或精斑,甚至长达数月或数年的一小块样品获得一个DNA指纹。

3. 重组DNA

限制酶发现后立刻使人们想到通过连接或重组酶切片段可以制造重组DNA,然后将含有感兴趣的靶基因DNA片段插入克隆载体。载体可以是质粒、噬菌体、病毒或小的人工染色体。一般来说,所有克隆载体都至少具有一个惟一的克隆位点,通过限制酶切后容许外源DNA插入专一位点。实际上最常用的载体在称为多接头的多克隆位点内都含有聚集在一起的几个限制位点组。图8.25给出了第一个被广泛应用的克隆载体质粒pBR322。

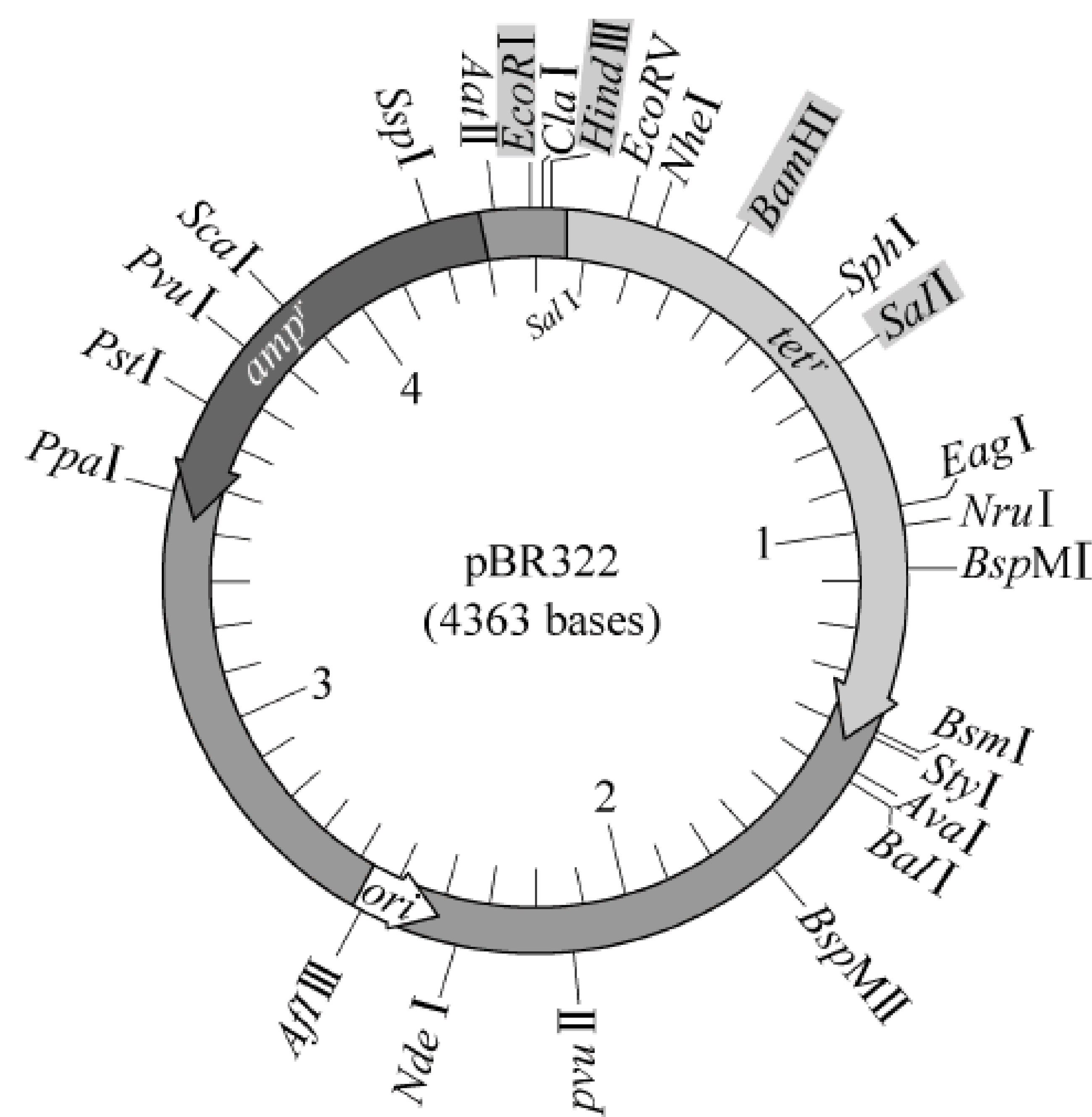


图8.25 常用的克隆载体质粒pBR322

质粒DNA由4363个碱基对构成,*amp*^{r}为氨苄青霉素抗性(ampicillin resistance)基因,*tet*^{r}为四环素抗性(tetracycline resistance)基因,*ori*为复制起始部位,其他缩写为不同来源的限制酶

图8.26给出了在实验室制作一个重组DNA分子的示意图。首先用同一种限制酶(图中为*Eco*RI)切割外源DNA和载体质粒。外源DNA可以是从组织或细胞中分离DNA的,或者是通过人工合成方法合成的DNA片段。

将酶切之后获得的带有切口的载体质粒与切出的外源DNA末端之间进行退火,形成一个嵌合质粒,但此时末端之间没有形成磷酸酯键。然后在DNA连接酶催化下末端之间通过形成磷酸酯键连接起来,构建成一个含有外源DNA的重组质粒。

接下来将重组质粒导入合适的宿主菌,通过细菌的繁殖,获得重组质粒的克隆。外源DNA分子导入宿主细胞时,如果是直接导入,称为遗传转化(genetic transformation)或称为转化(transformation);如果是利用一个病毒作为运载工具导入,称为转染(transfection)。转化(或转染)后,经在含有抗生素的培养基上培养,含有重组质粒或含有原来质粒(质粒自环化)的宿主菌大量繁殖,使得插入的DNA被大量复制。

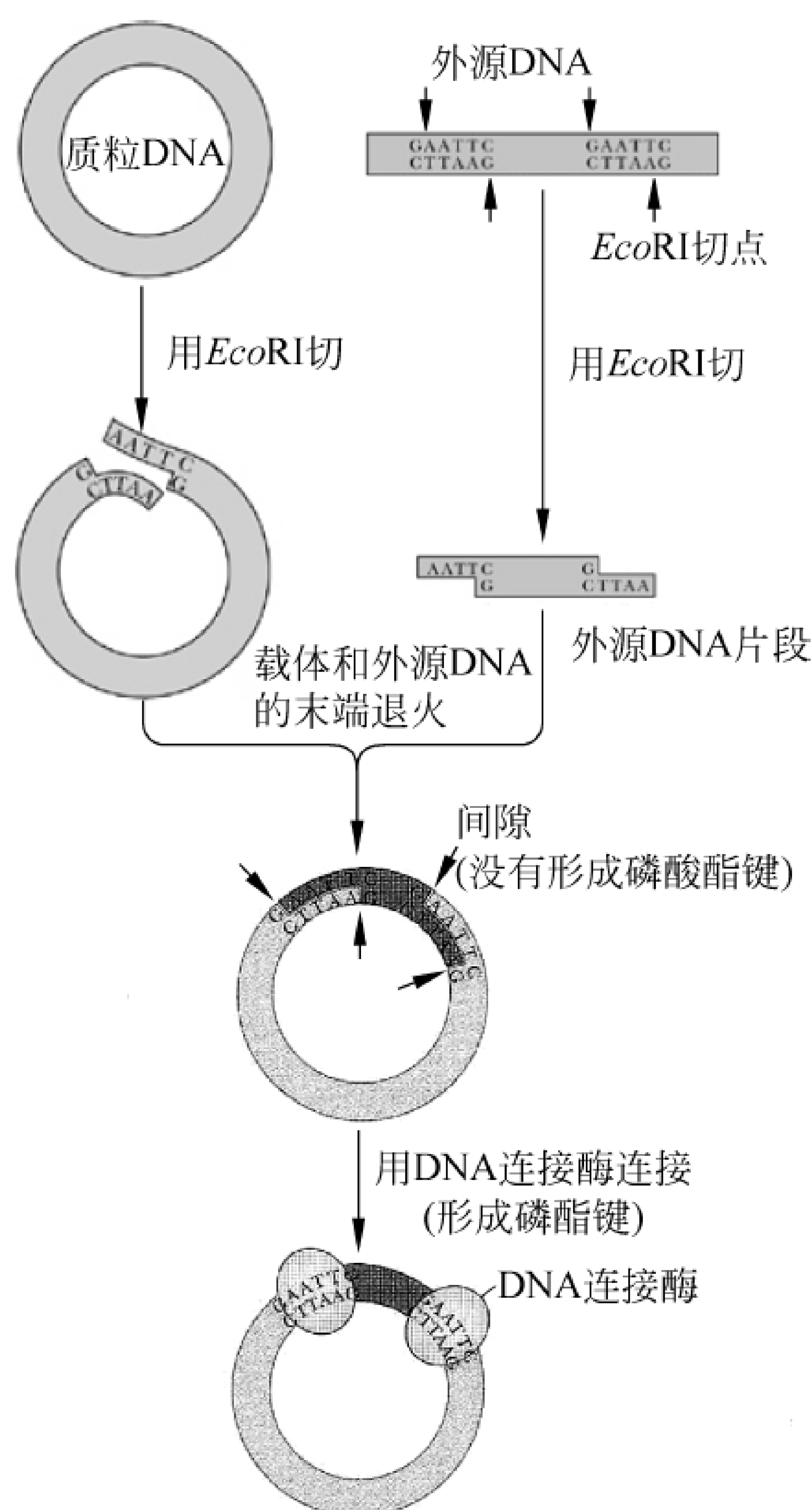


图 8.26　构建含有外源 DNA 的重组质粒

如果目的是为了由外源 DNA 生产蛋白质产品，需要另一个表达载体，因为这样的载体包含正确转录和翻译的调控序列。

相关话题　利用基因重组技术生产的人蛋白质

细菌体系常用于生产人蛋白质，培养细菌非常廉价并且操作起来也比较简单。目前通过基因重组技术可以生产人蛋白质，其中比较著名的成功例子有以下几种蛋白质。

1. 胰岛素

胰岛素是第一个通过基因工程技术生产的，并应用于临床治疗Ⅰ型糖尿病的人蛋白质。以往治疗Ⅰ型糖尿病的胰岛素通常都是从大量的例如猪和马等动物分离的。然而，从动物获得的胰岛素在多年使用后，约 5% 的糖尿病病人对外来蛋白产生严重的过敏症状。现在这些病人可以用来自细菌的人胰岛素治疗，不仅无副作用，而且费用仅为使用动物胰岛素的 10%。

2. 人生长激素

生长激素是用来治疗遗传性侏儒及包括艾滋病在内的肌肉萎缩症。过去，人类生长激素仅靠从尸体垂体中提取，但这样做存在着细胞有被 HIV 或其他疾病污染的危险。生长激

素是相对较大的蛋白质激素,氨基酸残基数在300个以上,但它却是没有糖残基的简单蛋白质,所以将生长激素克隆到细菌相对比较容易。

3. 纤溶酶原激活物和肠激酶

这两种蛋白可以溶解血块,如果它们注入处于心脏病发作和脑溢血危机时刻的病人体内,任一种蛋白质都可防止或减轻心脏和脑中血块导致的灾难性后果。没有基因重组技术,就不会得到足够的蛋白实际应用于临床治疗。

4. (促)红细胞生成素

(促)红细胞生成素是一种刺激骨髓生产红细胞的激素。这个相对小的蛋白质在肾透析期间会流失,健康的肾也会由血液中滤掉这个激素,但然后又会重新将它吸收回体内。患有慢性肾衰竭和透析等待肾移植的病人会因为红细胞不足而患上慢性贫血。这样的病人必须定期接收输血,就有感染上疾病或者发生过敏反应的危险。

安进(Amgen)公司生产的(促)红细胞生成素(Epogen)是利用基因研究人类激素并商业生产的最为成功的例子,已经临床应用。但合成它的初衷并不是治疗肾病病人,而是要通过它显著提高运动员的红细胞含量,达到提高成绩的目的。所以Epogen是一种禁药,一旦被查出,会被取消成绩并受到禁赛处罚。

8.7 聚合酶链式反应

重组DNA技术对于现代生物学各个领域的研究都是必不可少的,而有选择地放大(扩增)特定DNA,特别是一些微量而特殊的DNA序列,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)就是一种更为快速而便利的技术。这项技术是由Kary Mullis于1985年发明的,为此他获得了1993年的诺贝尔化学奖。

在试管内通过PCR进行的DNA复制反应与体内的基本原理相似,进行DNA合成反应,但使用的DNA聚合酶来自于嗜热水生菌(*Thermus aquaticus*)耐高温的*Taq* DNA聚合酶(*Taq* DNA polymerase),引物为合成的DNA,而不是RNA引物。通过加热(变性)、冷却(退火)和保温(延伸)等改变温度的方法进行DNA复制(图8.27)。反复进行变性→退火→延伸循环,理论上可以将DNA无限扩增。

图8.27通过3轮循环说明了PCR的基本原理。首先利用感兴趣的DNA序列两端序列信息合成寡核苷酸引物。当将含有过量引物、4种脱氧核苷三磷酸、感兴趣的DNA片段以及*Taq* DNA聚合酶的PCR体系升温至95℃左右时,双链DNA变性解离成两条单链。当反应体系冷却到50～60℃时,3′端和5′端引物分别与两条单链模板的互补区序列结合(退火),然后升温到72℃左右时,在热稳定性的*Taq* DNA聚合酶催化下引物延伸。经变性、退火和延伸3步反应完成PCR的一轮循环。此时反应体系中感兴趣的DNA片段已经被扩增了1倍。

在DNA合成的一个循环完成之后,反应体系中的混合物再重复上述变性、退火和延伸循环,只要仔细地控制好时间和温度,这样的循环可以重复很多次。每一轮循环过后,DNA链数会呈几何级数增加。如果重复30轮循环后,复制出的DNA产量就可达2^{30}拷贝,约为10^9拷贝。

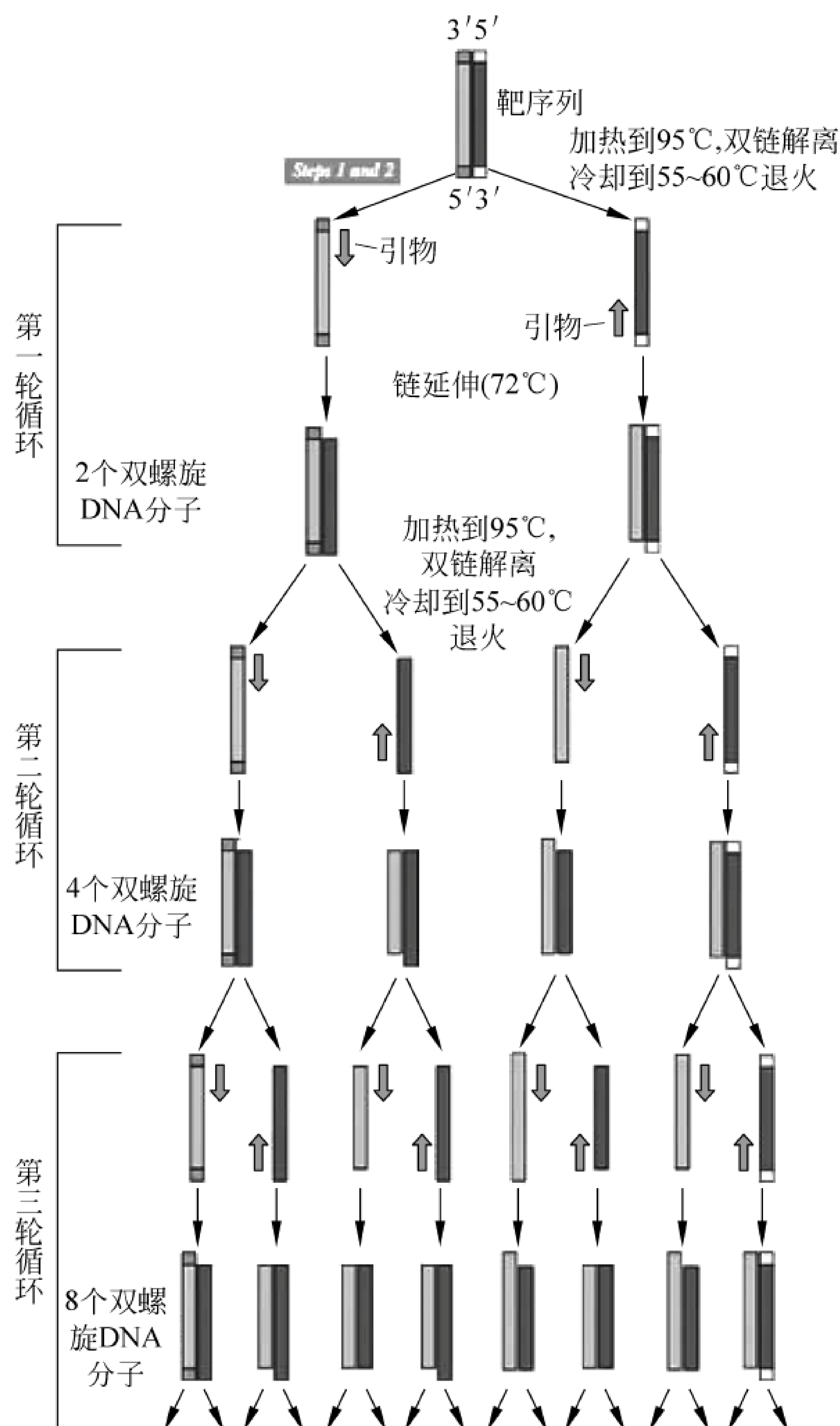


图 8.27 聚合酶链式反应(PCR)

8.8 DNA 核苷酸序列测定

介绍由 Sanger 等提出的一种在实验室能简单操作的双脱氧链终止测序法,该技术的发展与 DNA 电泳技术的发展分不开,因为 DNA 电泳能够做到可以将大小只差一个核苷酸的 DNA 片段分开。

Sanger 双脱氧链终止法的最大特点是引入了双脱氧核苷三磷酸(2′,3′-ddNTP)作为链延伸终止的核苷酸类似物。2′,3′-ddNTP 与一般的 dNTP 不同之处在于它的脱氧核糖的 3′位少了一个羟基,虽然在 DNA 聚合酶催化下可以与多核苷酸链的 3′羟基形成磷酸酯键,但由于缺少 3′位羟基,所以不能与下一个核苷酸形成磷酸酯键,结果使得多核苷酸链的延伸终止(图 8.28)。

利用链终止测序原理,在 4 个试管中,除了都加入单链 DNA 模板、放射性标记或荧光标记的引物(引物与模板 3′末端互补)、DNA 聚合酶和 4 种 dNTP 底物外,再分别加入少量

相应的 ddNTP,进行聚合反应。反应后生成 4 组片段,每组中都含有一套长度不同的片段,片段末端都应是相应的 ddN。4 组片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,可从自显影图谱上确定各个片段终止的位置(图 8.29)。

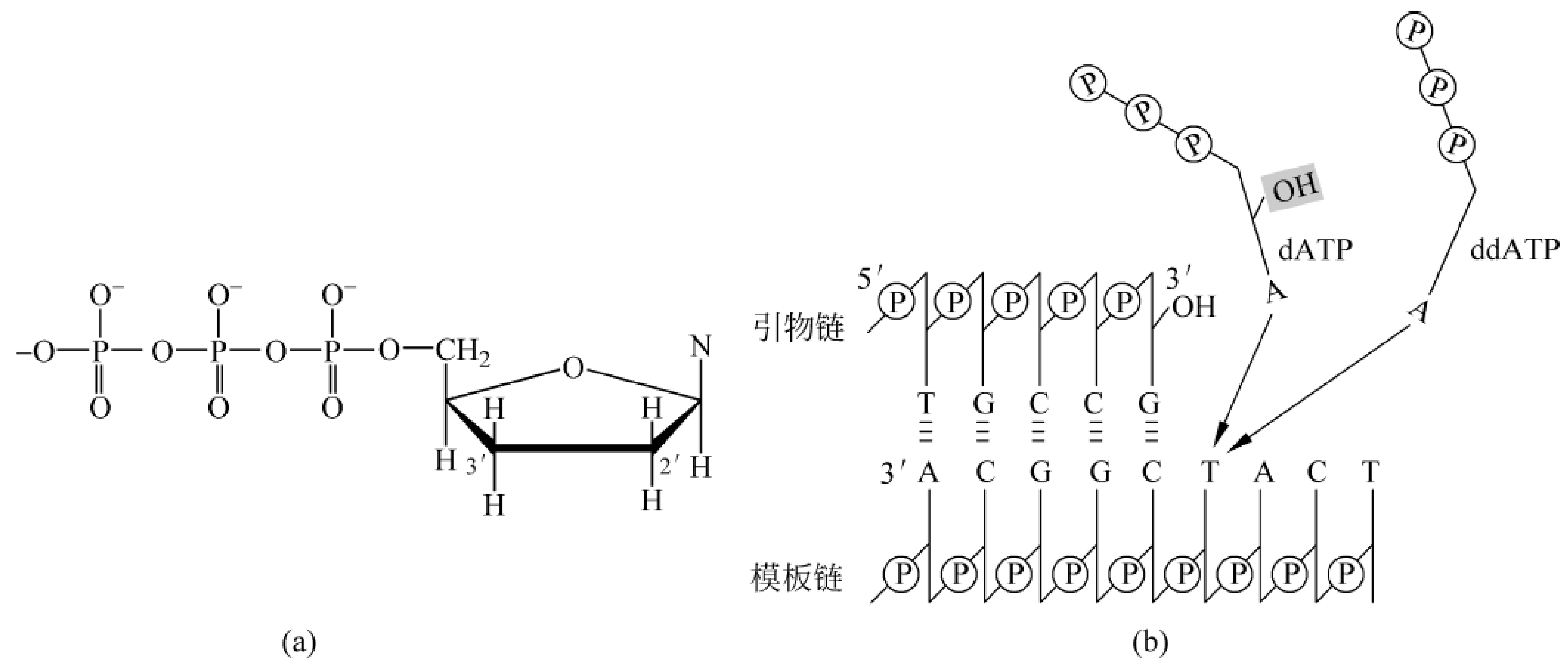


图 8.28　双脱氧核苷三磷酸结构和其终止链延伸的作用

(a) 双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)结构,N 代表任一碱基;(b)DNA 聚合酶催化的链延伸反应,dATP 和 ddATP 竞争与模板的 T 配对,当接上 ddA 时,链终止

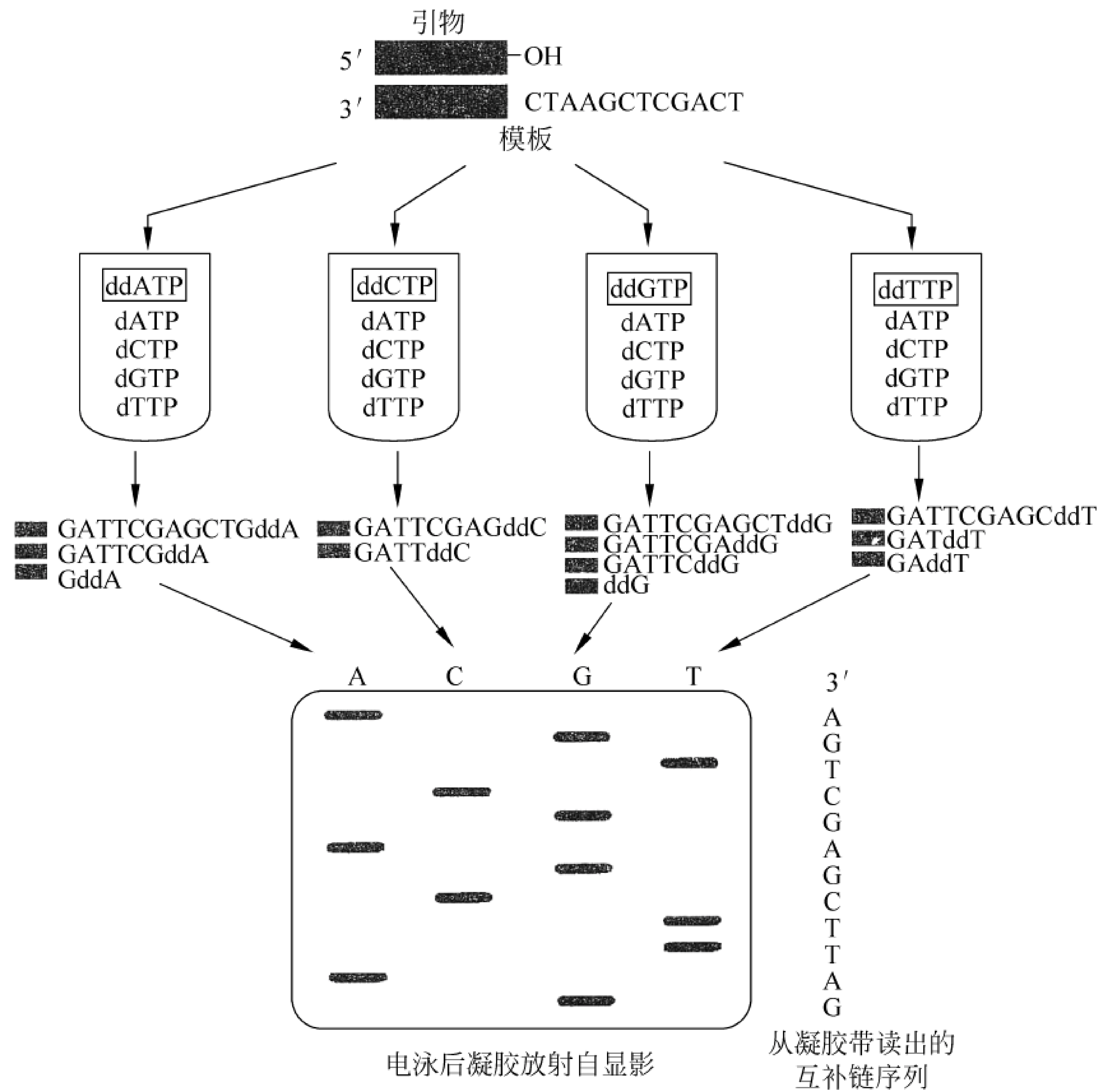


图 8.29　双脱氧链终止 DNA 测序

复制的 DNA 片段越短，即越靠近引物 5′端的片段，迁移越快，电泳后可直接由自显影照片底部依次往上读，读出的顺序就是与待测序列互补的序列。

现在 DNA 测序已经自动化了，其特征是在 4 种 ddNTP 上分别连上不同颜色的荧光分子，这样一来 Sanger 测序法中的 4 个管中的反应可合到一个管中进行。反应得到的带有 4 种不同颜色的片段通过毛细管电泳都是以单峰显示的。激光检测仪可检测每个峰的颜色，从颜色的顺序读出 DNA 序列。

小结

1. 核酸是核苷酸的聚合物，核苷酸是核苷的磷酸酯，核苷是核糖（或脱氧核糖）与碱基形成的 β-N-糖苷。

2. DNA 含有两条反向平行的核苷酸残基链，残基之间通过 3′-5′磷酸二酯键连接。一条链中的 A 和 G 与另一条链中的 T 和 C 分别配对。

3. DNA 双螺旋结构依靠氢键、疏水效应、碱基堆积相互作用以及电荷-电荷相互作用维持稳定。富含 G/C 的 DNA 的变性要比富含 A/T DNA 更难，因为 G/C 碱基对的堆积相互作用要比 A/T 碱基对的大。

4. 大多数常见的 DNA 分子构象称为 B-DNA，此外还有 A-DNA 和 Z-DNA 构象。

5. DNA 双螺旋过旋或欠旋可以产生使 B 构象恢复的超螺旋。负超螺旋 DNA 与含有局部解旋区域的 DNA 处于平衡。

6. 真核生物 DNA 分子被组蛋白包装形成核小体，进一步压缩并附着在染色体的支架使得中期染色体中 DNA 分子的长度总体上被压缩了 8000 倍。

7. 当双螺旋 DNA 处在破坏碱基对相互作用的条件下（例如加热或极端 pH 下），双螺旋变性，双链分开成两条单链。变性的 DNA 经退火作用可复性重新形成双螺旋结构。

8. 生物体内存在着 4 类主要的 RNA：rRNA、tRNA、mRNA 和小的 RNA 分子。RNA 分子是单链的，但也存在许多二级结构。

9. 核酸酶能够水解核酸的磷酸二酯骨架。碱水解 RNA 经历 2′，3′-环核苷单磷酸中间物过程。

10. 限制性内切酶在特殊的回文核苷酸序列处催化 DNA 的水解。特殊的甲基化酶可以保护限制性位点不被酶切。

11. 限制酶常用来构建 DNA 的限制谱、DNA 的指纹分析和构建重组 DNA 分子。

习题

1. 比较蛋白质 α 螺旋中的氢键和 DNA 双螺旋中的氢键，并指出氢键在稳定这两种结构中的作用。

2. 一段双链 DNA 包含 1000 个碱基对，其组成中 G+C 占 58%，那么该区含有多少胸腺嘧啶残基？

3. (a)一个 DNA 片段的两条互补链具有同样的碱基组成吗？(b)(A+G)等于(C+T)吗？

4. 一般来说DNA稳定,而mRNA不稳定。DNA稳定有什么生物学意义,mRNA不稳定又有什么意义?

5. 响尾蛇毒液中的一种蛋白质是一种磷酸二酯酶。聚核苷酸能够作为这个酶的底物吗? 能或不能都请说出理由。

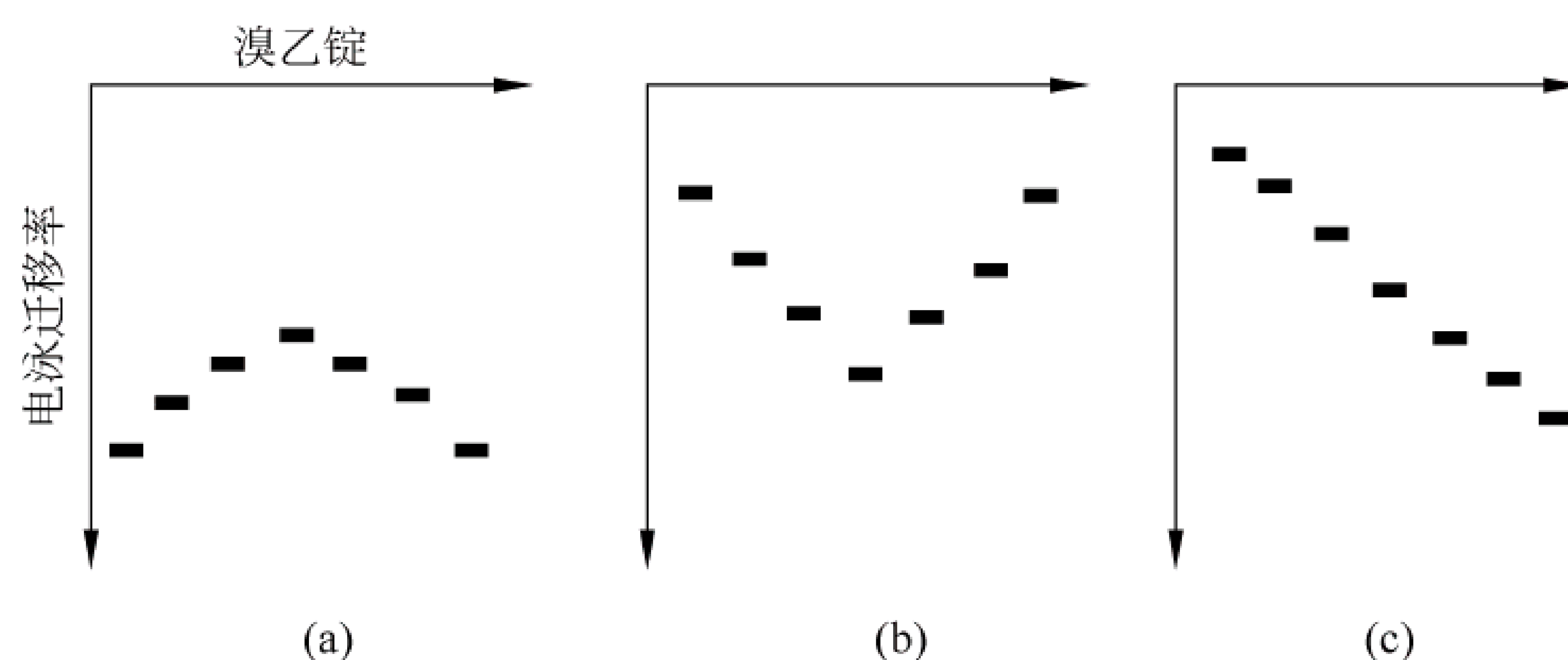
6. 溶液A中含有浓度为1mol的20bp的DNA分子,而溶液B中含有0.05mol的400bp的DNA分子,两种溶液中核苷酸残基数相等。假设DNA分子都有相同的碱基组成。

(a) 当两种溶液的温度都缓慢上升时,哪个溶液首先得到完全变性的DNA?

(b) 哪个溶液DNA复性的速度较快?

7. 人们将在中等温度(20～40℃)下生长的生物称为嗜温菌,在较高温度(45～70℃或更高)下生长的称为嗜热菌。试推测在这两种菌中DNA平均碱基组成会有什么差别,并解释原因。

8. 溴乙锭是一种可以插入到堆积的碱基对间表现出强荧光的染料。一种环状质粒样品分别与浓度递增的溴乙锭温育,然后用琼脂糖凝胶电泳进行分析。以下哪个凝胶电泳结果是正确的? 给出你的理由。



9. 人染色体基因组含有3.2×10^9碱基对。你从你母亲那继承了多少核小体?

10. 使用非变性凝胶电泳分离蛋白质时,蛋白质分子的大小,形状和电荷决定其在凝胶上的迁移率。而为何DNA用限制酶切割得到的片段电泳时,决定其迁移率的只有DNA的大小,而与其形状,电荷无关?

11. 乳酸脱氢酶(LDH)是由H和M亚基组成的四聚体蛋白,有5种LDH同工酶:$LDH_5(M_4)$、$LDH_4(M_3H)$、$LDH_3(M_2H_2)$、$LDH_2(MH_3)$和$LDH_1(H_4)$,你如何在细菌中克隆和表达人LDH_3?

9 DNA 复制和修复

DNA 是遗传信息分子，分子中特定的核苷酸顺序决定着生物体的遗传特征。一个亲代细胞在分裂为两个子代细胞之前，亲代细胞中的 DNA 应当忠实地被复制，通过复制把亲代的遗传信息传递给子代，从而使子代表现出亲代的遗传性状。

DNA 复制(DNA replication)也称为 DNA 合成，是在 DNA 聚合酶催化下进行脱氧核苷酸聚合反应，整个基因组被复制的过程。无论是在原核生物，还是在真核生物中发现的 DNA 聚合酶都是以单链 DNA 为模板，4 种脱氧核苷三磷酸 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)为底物合成一条互补的、反平行链的酶(图 9.1)。由于需要 DNA 作为模板，这样的酶叫作 DNA 指导的 DNA 聚合酶，简称为 DNA 聚合酶(DNA polymerase)。

DNA 聚合酶需要一个延伸 DNA 链的 3′-OH，3′-OH 对底物脱氧核苷三磷酸(dNTP)的 α-磷酸进行亲核攻击，形成磷酸酯键，释放出焦磷酸。焦磷酸经焦磷酸酶水解释放能量驱动聚合反应进行，结果在 3′末端加上了一个新的脱氧核苷酸。人们将这种聚合模式称为 5′→3′方向生长，即链的延伸由 5′端至 3′端。

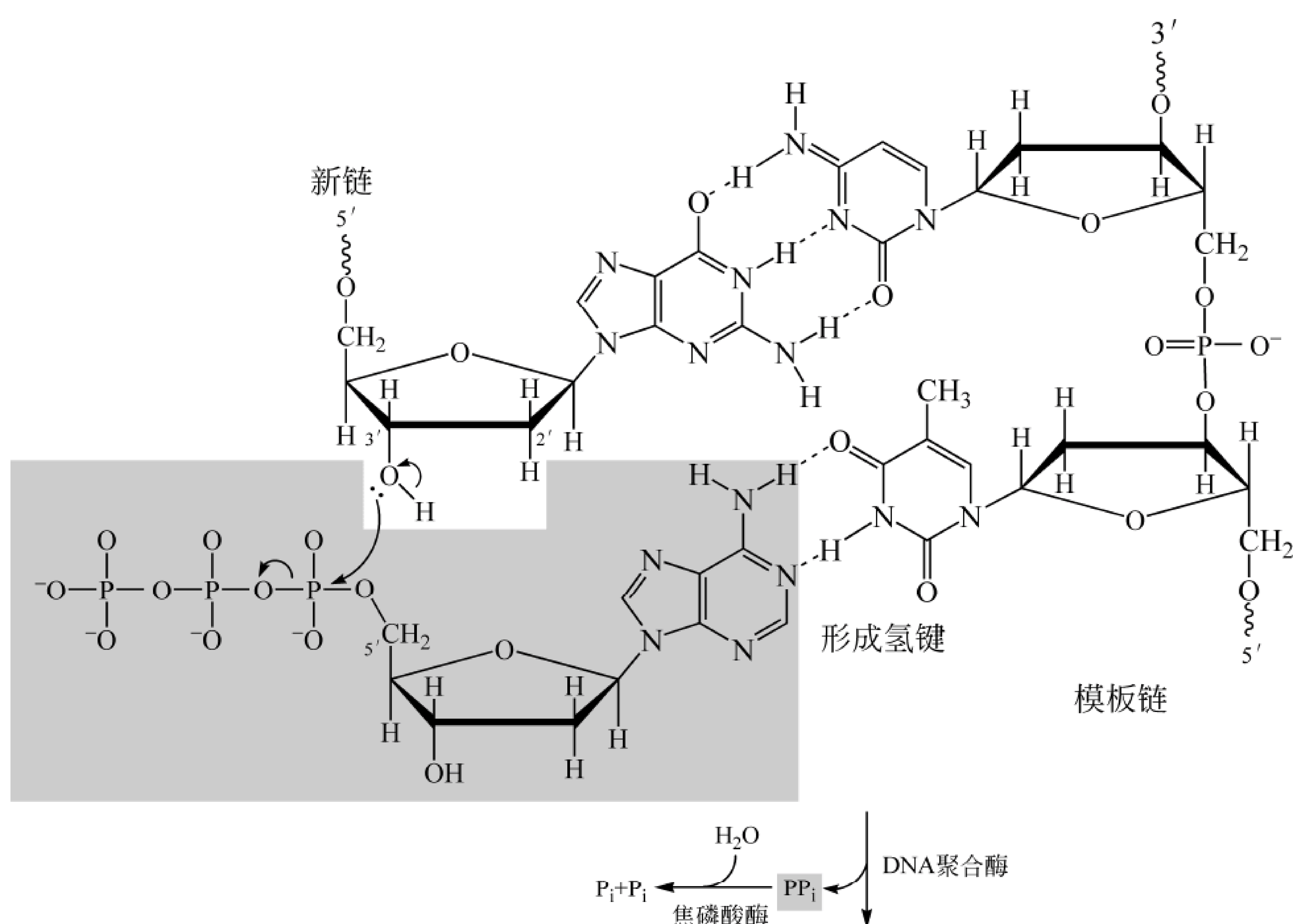


图 9.1 DNA 聚合酶催化的聚合反应

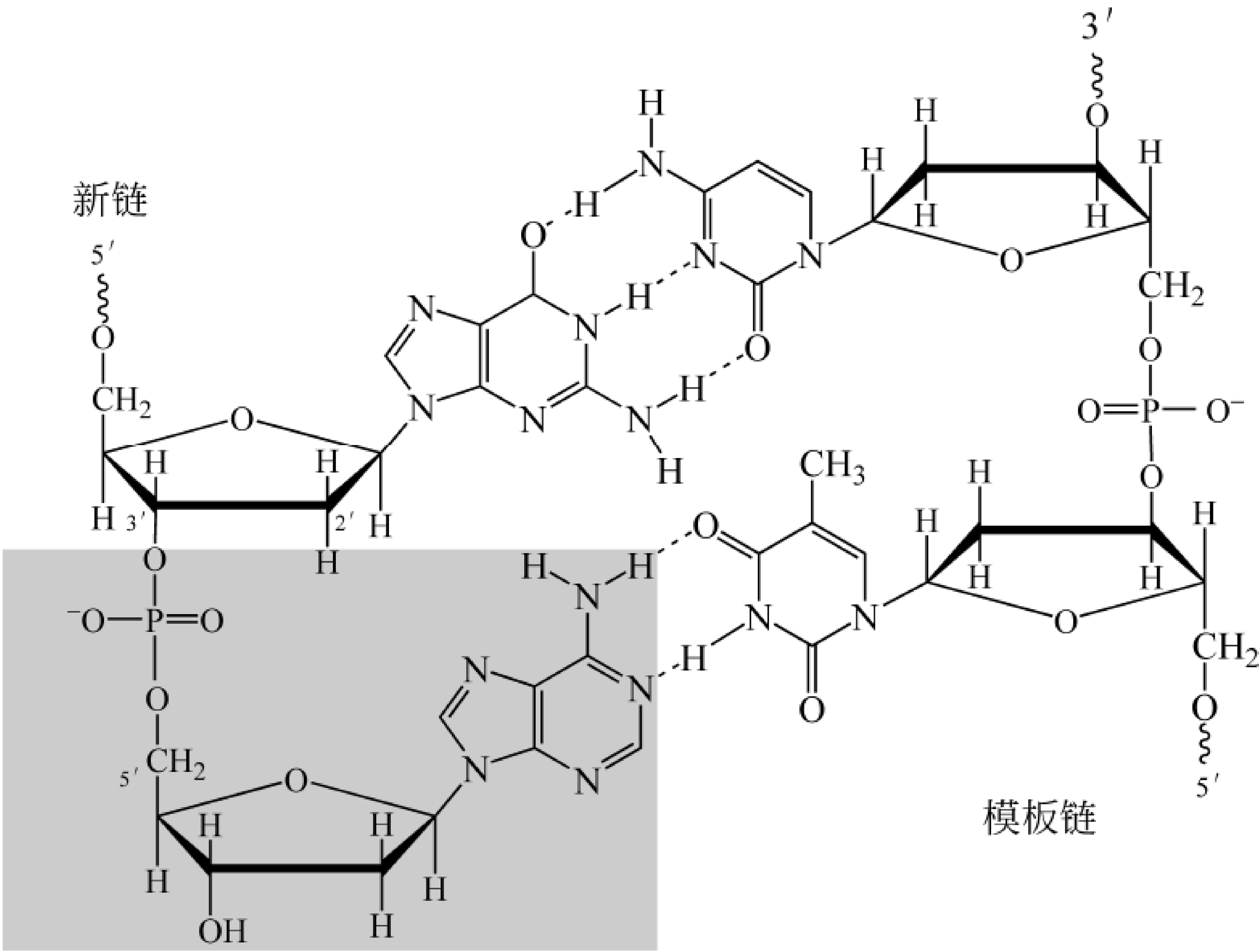


图 9.1(续)

9.1 DNA 复制概述

科学家曾经提出过两种模式来解释一个亲代 DNA 分子复制生成两个子代 DNA 分子。一种模式是全保留复制(conservative replication),即从亲代 DNA 的两条链复制出一个新的子代 DNA;另一种模式是半保留复制(semiconservative replication),是 Watson 和 Crick 根据他们自己提出的 DNA 双螺旋模型提出来的,即在子代的 DNA 中,一条链来自亲代,另一条链是新合成的(图 9.2)。

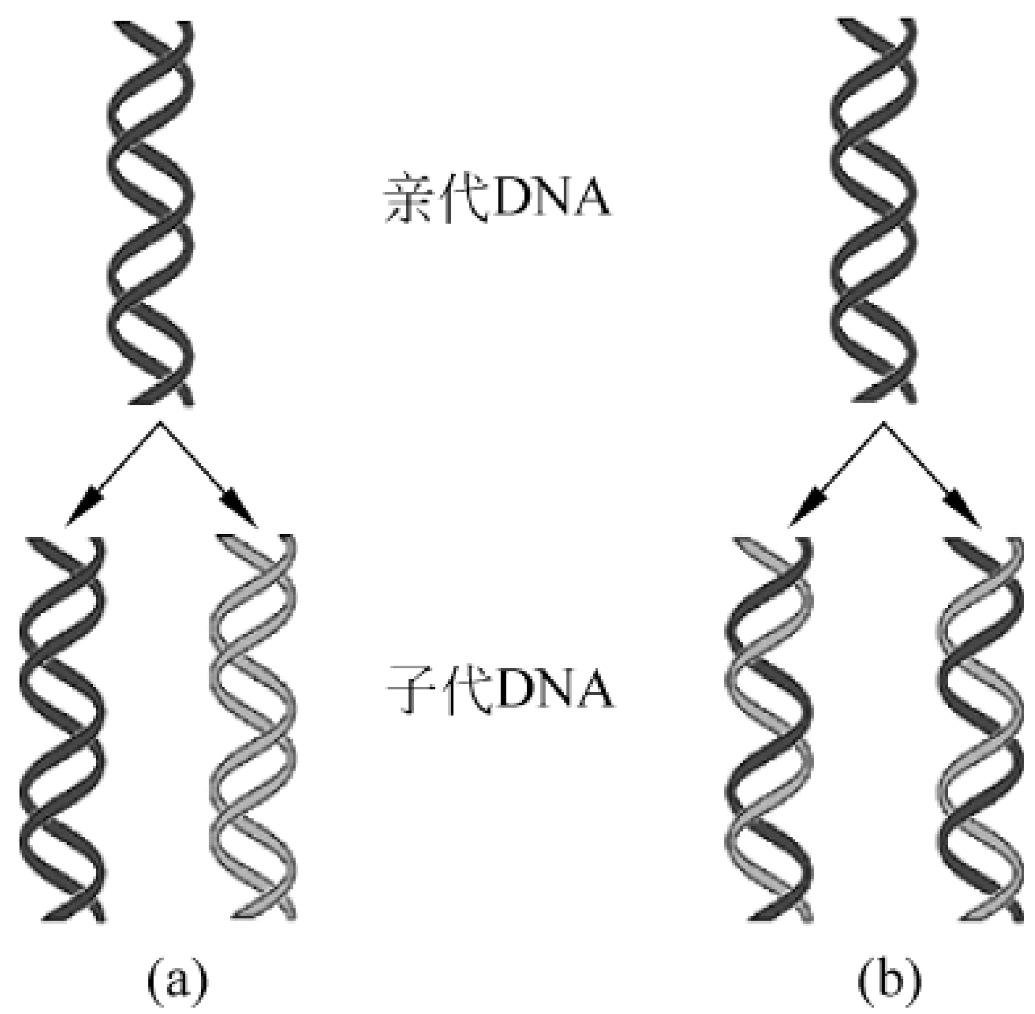


图 9.2 DNA 的两种可能的复制模式

(a)全保留复制:子代 DNA 中一个为原始的 DNA 双螺旋,另一个为完全新合成的 DNA 双螺旋。(b)半保留复制:亲代双链分开,作为模板合成互补的新链,形成子代 DNA 双链,即每个 DNA 双螺旋中含有一条亲代链和一条新合成链

9.1.1 半保留复制

两种复制模式都只是一种假说，实际的 DNA 复制究竟是哪一种模式？很多科学工作者从实验上进行了验证。其中最漂亮的实验当属哈佛大学生物系教授 Matthew Meselson 和他的学生 Franklin Stahl 的实验，实验结果于 1958 年发表，证明了 DNA 是按半保留模式进行复制的(图 9.3)。

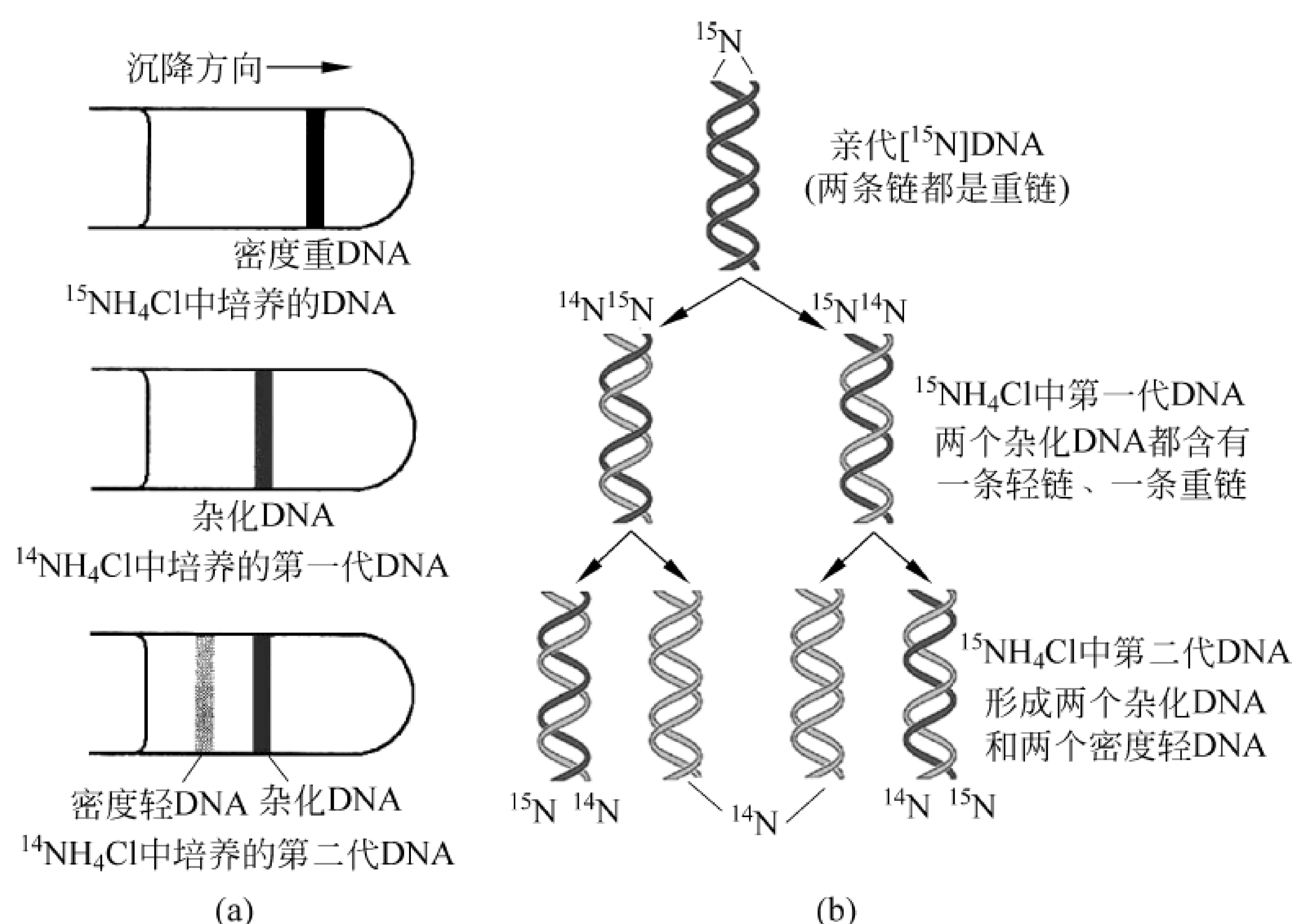


图 9.3 Meselson stahl 实验

(a) 密度梯度离心后的 DNA 带；(b) 对应于(a)中 DNA 带的解释

他们首先将 *E. coli* 在含有惟一氮源$^{15}NH_4Cl$(^{15}N 标记)的培养基中培养12 代以上，然后转移到另外含有$^{14}NH_4Cl$ 的培养基中培养两代。分别收集在^{15}N 氮源培养的菌体以及在^{14}N 氮源中培养的第一代和第二代菌体样品，提取 DNA，并进行氯化铯密度梯度离心，图 9.3(a)给出了离心后 3 种 DNA 样品在离心管中的分布。

图 9.3(b)对于 3 种 DNA 样品离心后带的分布给出了解释。在^{15}N 氮源中经 12 代培养的菌体的 DNA 都是^{15}N 标记的^{15}N-DNA 双螺旋，密度最大位于管底部。当转移到^{14}N 氮源培养一代后形成了杂化 DNA，^{15}N，^{14}N-DNA 双螺旋(一条^{15}N-DNA 链和一条^{14}N-DNA 链)，密度比^{15}N-DNA 双螺旋小，位于管中部。培养到第二代除了形成^{15}N，^{14}N-DNA 外，还形成一个^{14}N-DNA 双螺旋，其密度最小，位于管顶部。

实验结果表明，DNA 复制时双链解开，分别作为模板合成新链，就是说在子代的 DNA 中，一条链来自亲代，另一条链是新合成的。实验圆满地证明了 DNA 的半保留复制。如果 DNA 是按全保留方式复制，密度梯度离心后形成的 DNA 带中只有底部和顶部两条带，不会出现管中部带。

后来实验证明真核生物的 DNA 复制也是采取半保留复制模式。

9.1.2 双向复制

证实了DNA是按半保留模式复制后,人们又想到复制像图9.4(a)那样从一个起点开始单向进行(单向复制),还是像图9.4(b)那样从一个起点同时沿两个方向进行(双向复制)呢?复制时亲代DNA解旋,新链合成部位像一个"叉子",所以这个部位被称为复制叉(replication fork)。显然单向复制只存在一个复制叉,双向复制就应当存在着两个复制叉。

John Cairns等利用放射性核素[H^3]标记的胸腺嘧啶对*E. coli*细胞分裂时DNA复制进行了追踪。首先将生长着的*E. coli*于[H^3]胸腺嘧啶轻度标记的培养基中培养几代,在放射自显影图中可看到所有的DNA都被标记了。接着在DNA被分离之前再将大量的[H^3]胸腺嘧啶加入到培养基中培养几秒钟,然后分离DNA,进行放射自显影分析[图9.4(c)]。重度标记出现在两个分支点处,而不是一个分支点,证明DNA复制是双向复制。

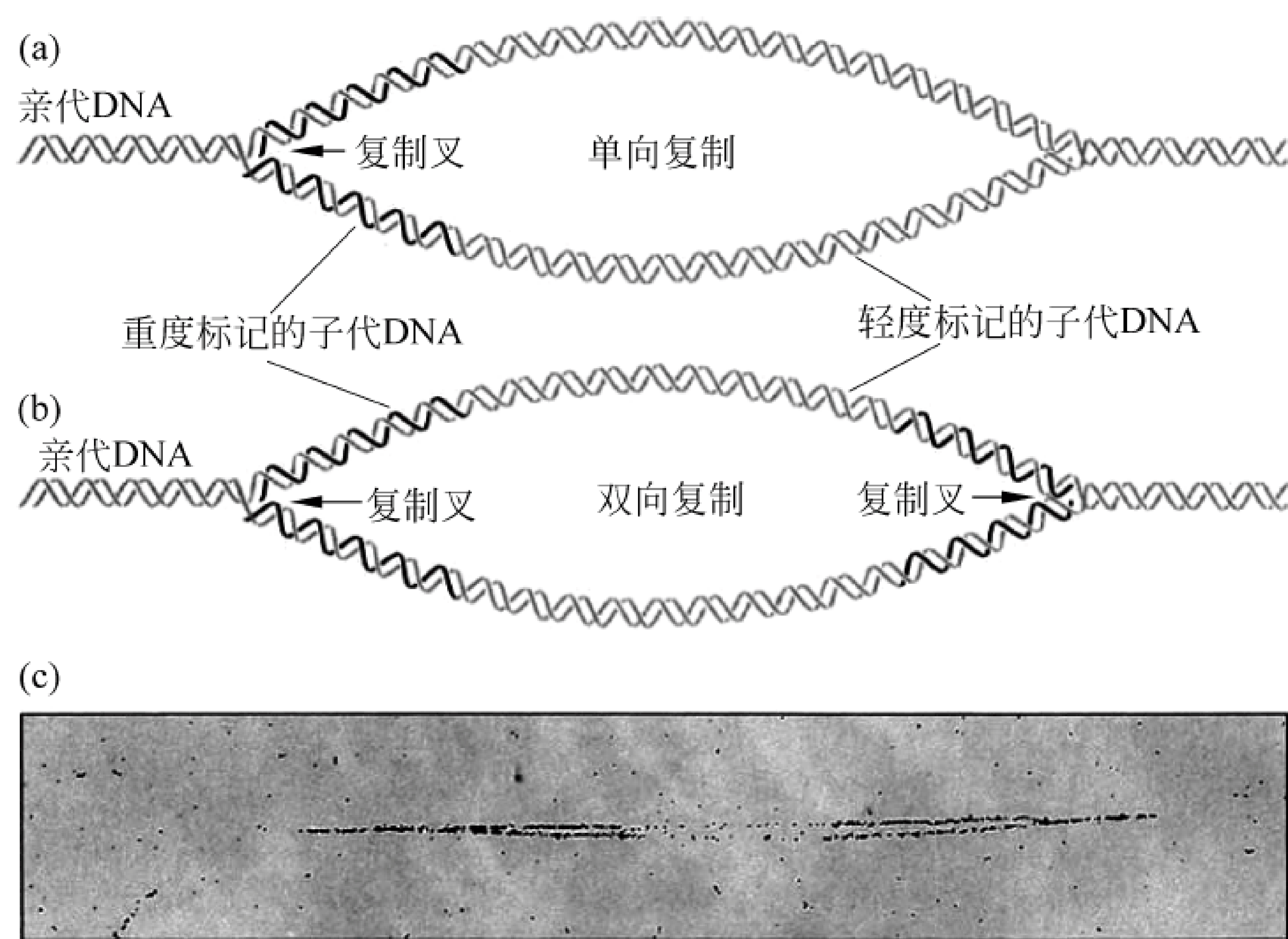


图9.4 两种复制模式

(a) 单向复制模式(只有一个复制叉);(b) 双向复制模式(有两个复制叉);
(c)*E. coli* DNA复制的放射自显影图,表明复制是双向复制

9.1.3 半不连续复制

DNA复制首先遇到的问题是:DNA两条链是反向平行缠绕在一起的,一条为5′→3′方向,另一条为3′→5′方向,而DNA聚合酶只能催化以3′→5′链为模板,按照5′→3′方向的聚合反应,那么这两条链又是怎样同时作为模板合成子代DNA的呢?

显然以与复制叉移动方向一致的3′→5′链为模板,DNA聚合酶可以沿照5′→3′方向连续合成其中的一条子代DNA链。然而以与复制叉移动方向相反的3′→5′链为模板又是如何合成另一条子代DNA链的呢?1968年,冈崎等将*E. coli*在含有^{3}H标记的胸苷的培养基培养几秒钟后,然后杀死细菌,分离DNA,测定新合成的DNA放射性。发现核素出现在长度为1000~2000个核苷酸残基的片段上,后来称为冈崎片段(okazaki fragment)(真核生

物中，冈崎片段长度为100～200个核苷酸残基）。如果培养时间延长到1或2分钟，核素则出现在大的DNA片段上了。

冈崎根据实验结果提出了DNA两条链以不同方式复制的半不连续复制模型。与复制叉移到方向一致的3′→5′模板链随着复制叉移动连续合成子代链，该链被称为前导链(leading strand)；而与复制叉移动方向相反的3′→5′模板链随着复制叉移动先合成一些冈崎片段，然后经DNA连接酶连接成一条链，该链被称为后随链(lagging strand)(图9.5)。

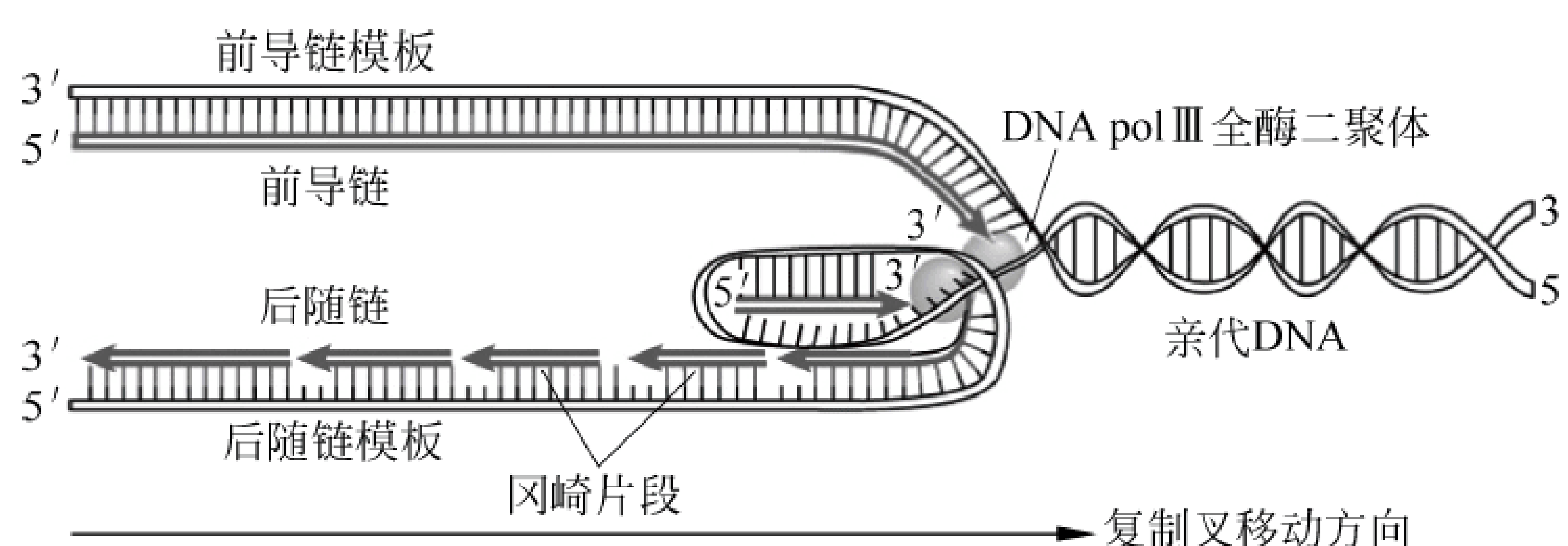


图9.5 一个DNA复制叉处的半不连续复制模式

两条子代链都是沿照5′→3′方向合成，前导链连续合成，后随链不连续合成

在*E. coli*中由于DNA复制是在DNA聚合酶Ⅲ全酶复合物催化下完成的，复合物中的两个DNA聚合酶Ⅲ全酶分别执行前导链和后随链的合成。图9.5中后随链模板绕成一个环，看上去两条链合成方向与复制叉移动的方向一致，好像DNA聚合酶Ⅲ全酶同时延伸两条新链，两条链合成齐头并进，实际上前导链的合成应当先于后随链。

9.2 原核生物DNA复制

现在人们从分子水平了解的绝大多数有关DNA复制的信息都是通过研究细菌和病毒DNA复制获得的，相对于真核生物来说，原核生物DNA复制研究得更深入。由于原核生物与真核生物中DNA复制非常相似，所以很多细菌中复制的信息可以运用到真核生物。

9.2.1 DNA聚合酶

Arthur Kornberg于1956年在*E. coli*的提取液中首先发现了DNA聚合酶Ⅰ(DNA polⅠ)，后来人们又陆续发现了DNA聚合酶Ⅱ(DNA polⅡ)、DNA聚合酶Ⅲ(DNA polⅢ)、DNA聚合酶Ⅳ和DNA聚合酶Ⅴ等DNA聚合酶。DNA polⅠ参与复制过程中DNA的一条链(后随链)的合成和DNA的修复；DNA polⅡ的作用主要表现在DNA修复；DNA polⅢ主要担负复制期间DNA链的延伸(复制)任务。

DNA polⅢ是3种聚合酶中最大和最复杂的酶，由10个不同的多肽亚基组成(表9.1)，纯化的DNA polⅢ全酶是不对称的二聚体(图9.6)。其中的α、ε和θ结合形成两个核心复合物(各含一个α、ε和θ)，负责聚合反应，所以也称为核心酶。4个β亚基形成两个滑箍，分别夹住复制叉处两条DNA链的一条链，并可沿着DNA滑动。单独的核心酶持续合成能力相当低，但当β二聚体结合后，可使核心酶连续合成能力大大提高。其余的大多数亚基组成γ复合物，也称为“滑箍载体”，其主要作用是在连续聚合反应中参与复制体的组装和保持酶与亲代DNA的结合。

表 9.1　DNA pol Ⅲ全酶的亚基组成和功能

亚基	亚基数目	相对分子质量		结构基因	功　能
α	2	130 000	核心酶	*PolC*(*dnaE*)	聚合酶
ε	2	27 500		*dnaQ*	3′→5′外切酶
θ	2	8 600		*holE*	组装 α、ε
β	4	41 000		*dnaN*	形成滑箍
τ	2	71 000		*dnaX*	增强核心酶二聚化,ATP 酶
γ	2	47 500	γ复合物	*dnaX*(*Z*)	增强复制的连续性,帮助复制体组装
δ	1	39 000		*holA*	
δ′	1	37 000		*holB*	
χ	1	17 000		*holC*	
ψ	1	15 000		*holD*	

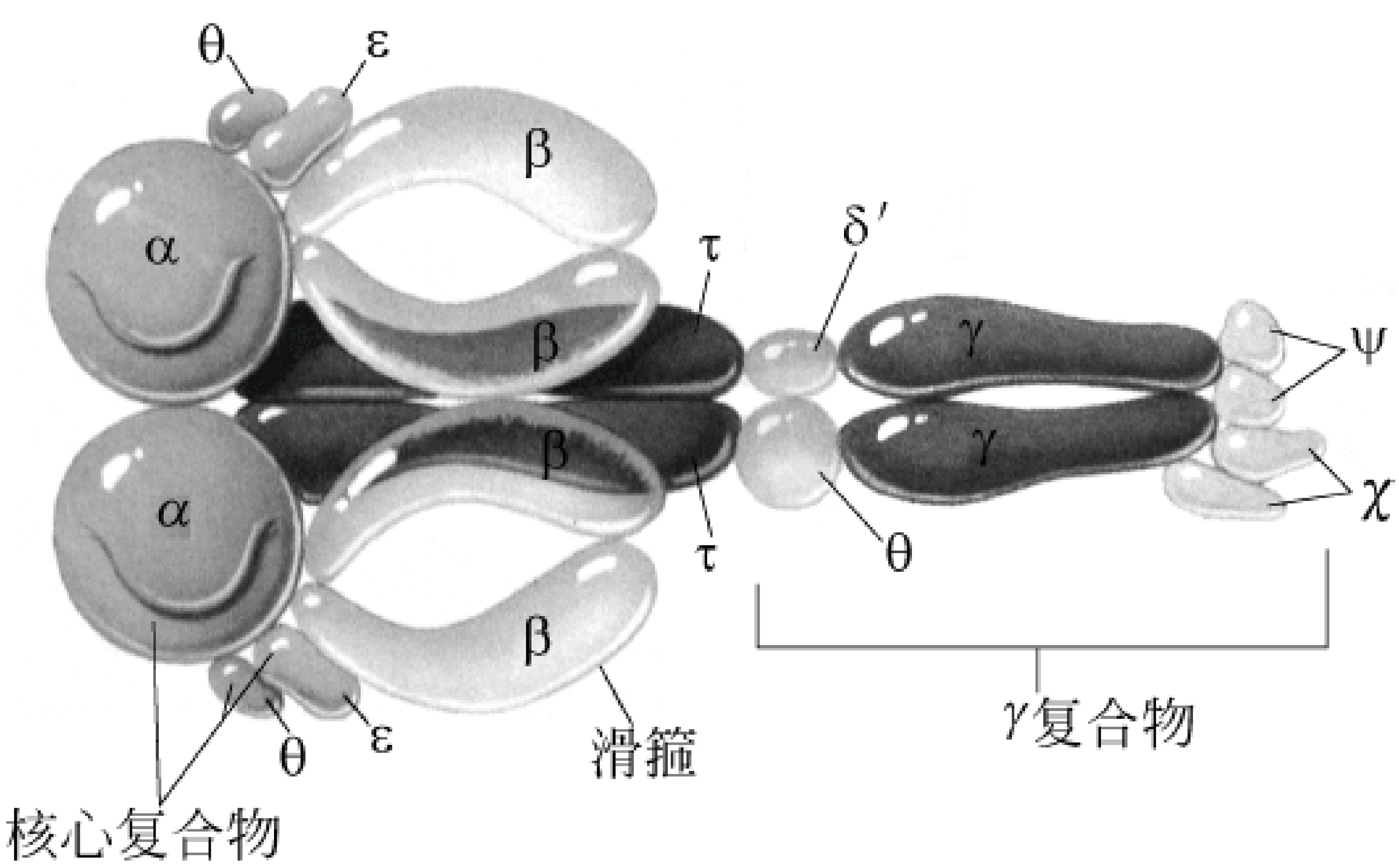


图 9.6　*E. coli* DNA pol Ⅲ全酶的亚基组成示意图

全酶由两个核心复合物(含有 α、ε 和 θ)、两个滑箍($2\beta_2$)、一对增强核心酶二聚化的 τ 和一个 γ 复合物($\gamma_2\delta\delta'\psi_2\chi_2$)组成

9.2.2　DNA 复制

E. coli DNA 复制开始于惟一的一个由 245bp 构成的称为 *oriC* 区的染色体部位,该区域序列富含 A-T 碱基对。约 20 个 DnaA 蛋白与 *oriC* 区结合引起该部分 DNA 结构发生变化,DnaB 蛋白(解旋酶)在另一个 DnaC 蛋白的协助下结合在起点处,依赖于 ATP 水解从起点向两个方向使模板双螺旋 DNA 解旋,形成两个复制叉。一旦解旋变成单链 DNA 后立刻被单链结合蛋白(single-stranded binding protein,SSB)结合,防止两个互补单链重新形成双螺旋。

解旋酶在使 DNA 双链解旋的同时,解旋作用会产生正超螺旋,在一定程度上可被原有的负超螺旋抵消,但在复制叉处的连续解旋导致的扭转张力,需要 DNA 回旋酶作用产生额外的负超螺旋予以抵消。

表 9.2 给出了 *E. coli* DNA 复制涉及的主要蛋白质,图 9.7 给出了在 *E. coli* 的一个复制叉处的 DNA 复制示意图。

表 9.2　*E. coli* 中 DNA 复制涉及的蛋白质

名　　称	功　　能
DNA 回旋酶(拓扑异构酶Ⅱ)	引入负超螺旋；使 DNA 解旋
SSB(单链结合蛋白)	结合单链 DNA
DnaA	起始因子；结合起点的蛋白
DnaB	5′→3′解旋酶(使双螺旋 DNA 解旋)
DnaC	帮助 DnaB 结合在起点
DnaT	协助 DnaC
引物合成酶(DnaG)	合成 RNA 引物
DNA polⅢ全酶	链延伸(DNA 合成)
DNA 聚合酶Ⅰ	切去 RNA 引物，填充 DNA 片段
DNA 连接酶	连接冈崎片段
Tus	终止

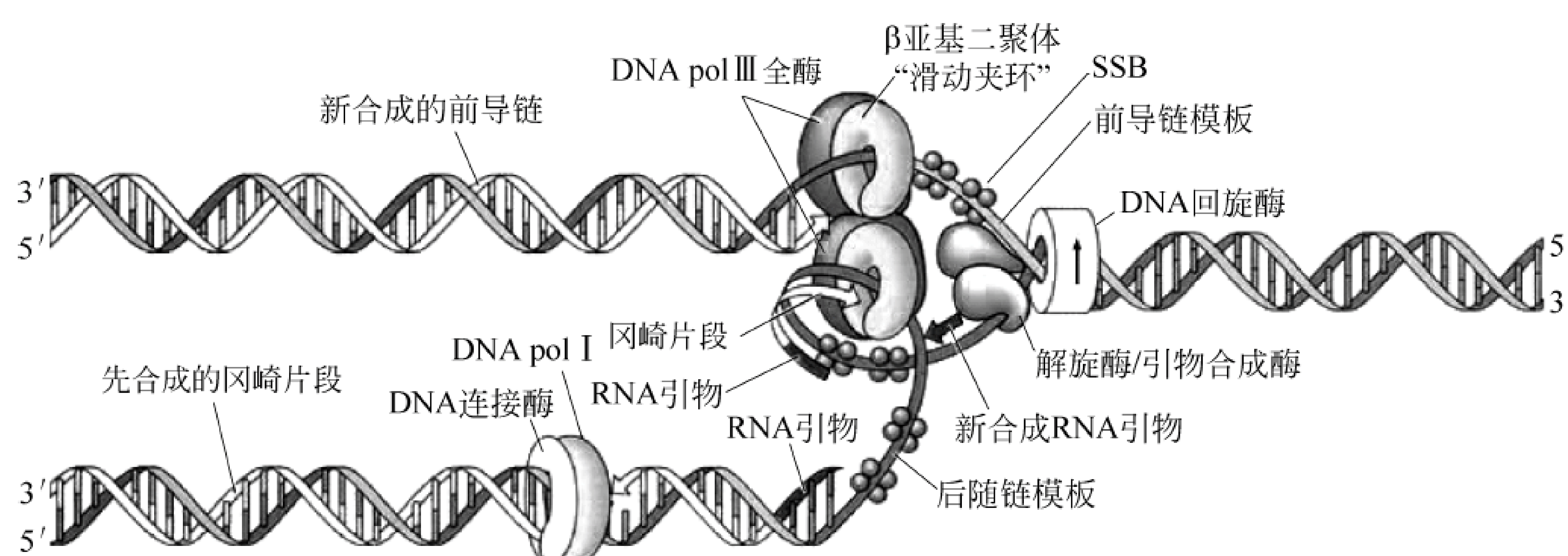


图 9.7　复制叉处 DNA 复制

从图 9.7 给出的 DNA 复制示意图可看到 DNA 回旋酶和解旋酶使 DNA 双链解开，被解开的 DNA 单链区与 SSB 结合维持着单链状态。虽然 DNA 模板暴露出来，但也不能直接合成新的 DNA，因为 DNA pol Ⅲ全酶不能从头合成，所以无论是前导链，还是后随链合成都需要一个带有 3′-OH 的 RNA 引物。此时 DnaG(引物合成酶，primase)以 DNA 为模板合成一段与之互补的 RNA 引物。有了 RNA 引物，DNA pol Ⅲ全酶开始合成新的 DNA 链，因此也可以说 RNA 启动了 DNA 的合成。

前导链只需合成一次 RNA 引物，DNA pol Ⅲ全酶就可以以 3′→5′链作为模板连续合成新的 5′→3′前导链。但后随链的模板是与前导链模板反平行的另一条 3′→5′链，实际上后随链的合成与复制叉移动方向相反。复制叉每移动一段核苷酸序列就需要合成一个 RNA 引物，因此后随链合成需要很多 RNA 引物。有了 RNA 引物，先合成许多冈崎片段，然后连成大的 DNA 片段，合成后随链。

将冈崎片段连接成大的 DNA 片段的任务是由 DNA polⅠ和 DNA 连接酶完成的。DNA polⅠ首先结合在冈崎片段起始端的 RNA 引物处，利用本身的 5′→3′外切酶活性切去 RNA 引物，出现一个切口(缺口)。然后再利用本身的 5′→3′聚合酶活性按照 DNA 模板延伸子代 DNA 链，实际上就是沿着 3′方向平移切口，这一过程称为切口平移(nick translation)。切口平移至相邻冈崎片段的 5′磷酸端(一个磷酸酯键的间隙)，再通过 DNA

连接酶(ligase)催化3′羟基和5′磷酸之间形成磷酸二酯键,将两个冈崎片段连接起来(图9.8)。DNA连接酶催化反应需要辅酶NAD^+。

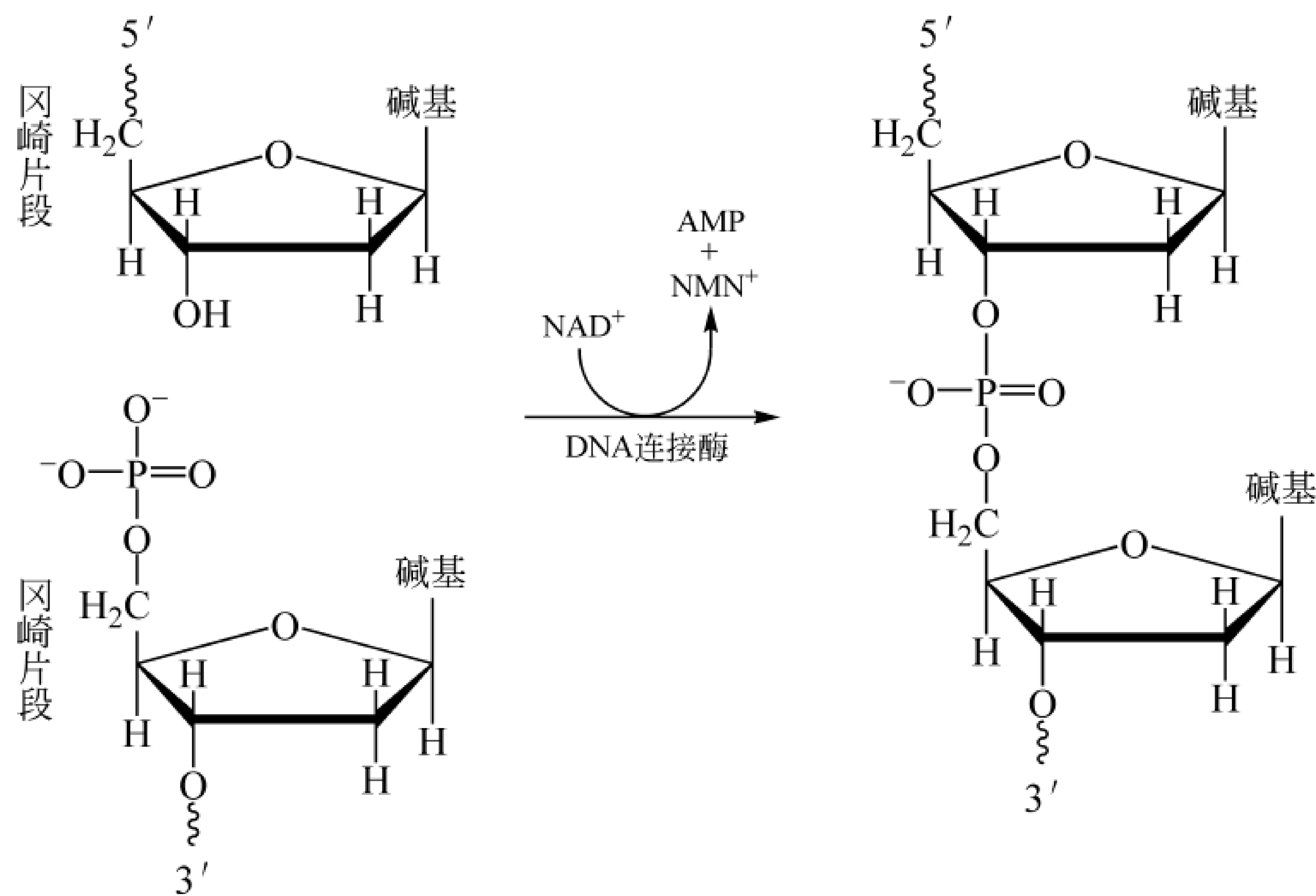


图9.8 连接酶反应

两个冈崎片段经DNA连接酶催化连接成一个片段,NMN^+为尼克酰胺单核苷酸

E. coli DNA复制终止于环状染色体*oriC*区对面的终止区(terminus,*ter*)内。两个反向复制叉在*ter*区相遇,复制便终止。*ter*区内含有一些短的DNA序列:*terA*、*terD*、*terE*、*terC*、*terB*、*terF*和*terG*,都含有共有的核心序列5′-GTGTGTTGT-3′,起着终止复制的作用,称为终止子。为了确保两个反向复制叉在*ter*区相遇,完成整个DNA的复制,这些终止子被分为两组,一组由*terC*、*terB*、*terF*和*terG*构成的终止子负责终止顺时针方向的复制叉移动,称为顺时针方向的复制叉终止子;另一组由*terA*、*terD*和*terE*构成的终止子负责终止逆时针方向的复制叉移动,称为逆时针方向的复制叉终止子(图9.9)。

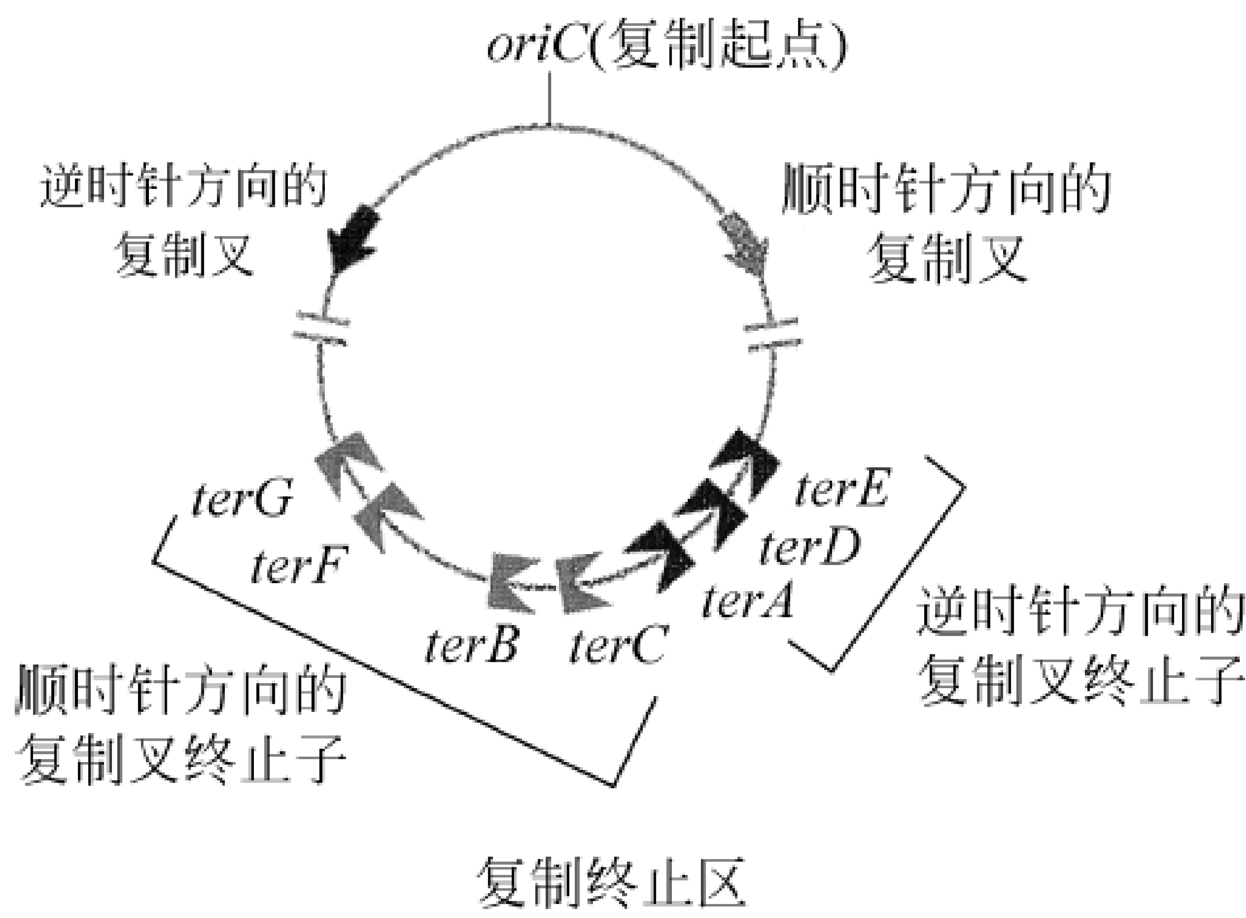


图9.9 *E. Coli*中的*ter*区

这些终止子就像“单向阀”一样,如图9.9所示,一个沿着顺时针方向移动的复制叉可以通过*terE*、*terD*和*terA*逆时针终止子,但当遇到*terC*、*terB*、*terF*或*terG*顺时针终止子时便会停下来。同样的道理,一个沿着逆时针方向移动的复制叉可以通过*terG*、*terF*、*terB*和*terC*顺时针终止子,但当遇到*terA*、*terD*或*terE*逆时针终止子时便会停下来。

*ter*发挥使复制叉停止的功能还需要一个特殊的Tus蛋白[terminus utilization substance,Tus(终止利用物质)]。Tus能够特异地与*ter*结合,Tus是个抗解旋酶,它通过抑制依赖于ATP水解的DnaB解旋酶活性,防止DNA双螺旋解旋来阻止复制叉前进。一旦复制叉遇到Tus-*ter*复合物时复制便停止,来自另一个方向的复制叉遇到已停止的复制叉时复制也随之停止。最终完成两个双螺旋的合成。

在整个染色体被复制后，两个环状的双螺旋 DNA 分子从拓扑学上看，像一个连环那样连锁在一起，然后连锁的两个染色体经 DNA 拓扑异构酶Ⅳ催化分开，在细胞分裂时分别进入两个子代细胞。

9.3 真核生物 DNA 复制

真核生物染色体都比细菌染色体大得多。例如 *E. coli* 基因组是由 4.6×10^3 kbp 组成的单一染色体，而果蝇(*Drosophila melanogaster*)的基因组是 1.65×10^5 kbp，哺乳动物基因组大约平均为 3×10^6 kbp(单倍体 DNA 含量)。另外，真核生物通常含有一个以上的染色体，例如果蝇含有 3 对大的和一对小的染色体，而哺乳动物含有的染色体数取决于物种，一般为 20～30 对染色体。

虽然染色体数目的增加使得基因组更复杂，但所有生物中 DNA 复制的生物化学机制基本上是类似的。例如真核生物也像原核生物那样，前导链的合成是连续的，而后随链的合成是不连续的，引物合成、冈崎片段合成、RNA 引物水解后填充与模板链互补的核苷酸等所有的过程都与细菌中的类似。

从目前对真核生物 DNA 复制的研究看，与原核生物 DNA 复制相比，真核生物 DNA 复制还有以下一些特点。

9.3.1 DNA 聚合酶

大多数真核细胞至少含有 5 种不同的 DNA 聚合酶：α、β、γ、δ 和 ε(表 9.3)。DNA 聚合酶 α、β 和 γ 主要催化 DNA 复制的链延伸及一些修复反应。DNA 聚合酶 β 是细胞核中发现的 DNA 修复酶，而 DNA 聚合酶 γ 主要负责线粒体 DNA 的复制。还有一个负责叶绿体 DNA 复制的第 6 个 DNA 聚合酶。

表 9.3 真核生物 DNA 聚合酶

名　　称	活　　性	作　　用
聚合酶 α	聚合酶 引物酶 3′→5′外切酶	引物合成 修复
聚合酶 β	聚合酶	修复
聚合酶 γ	聚合酶 3′→5′外切酶	线粒体 DNA 复制
聚合酶 δ	聚合酶 3′→5′外切酶	后随链合成 修复
聚合酶 ε	聚合酶 3′→5′外切酶 5′→3′外切酶	修复 填充后随链上缺口

DNA 聚合酶 δ 催化复制叉处后随链的合成，这个酶由两个亚基组成，其中的大亚基含有聚合酶活性部位。另外该酶还具有 3′→5′外切酶活性，能够确保真核细胞 DNA 复制极端精确。DNA 聚合酶 α、β 和 γ 主要催化 DNA 复制的链延伸以及一些修复反应。

DNA 聚合酶 α 是一个多聚体蛋白质,具有 DNA 聚合酶和 RNA 引物酶活性。由 DNA 聚合酶 α 合成的引物由一段 RNA 引物和紧随其后的 DNA 引物构成,这一引物再经 DNA 聚合酶 δ 催化延伸成一个冈崎片段。

聚合酶 ε 是一个大的多聚体蛋白质,其中最大的多肽链具有聚合酶活性和 3′→5′校正外切酶活性。聚合酶 ε 起着修复酶的作用,也能够填充两个冈崎片段之间的缺口。

在真核细胞中复制叉还涉及几种辅助蛋白,这些蛋白质的功能很像细菌复制体中的某些蛋白质。例如增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)形成一个类似于 *E. coli* DNA 聚合酶Ⅲ全酶的 β-亚基滑箍那样的结构。辅助蛋白复制因子 C(replication factpr C,RPC)从结构、功能和进化上都与 DNA 聚合酶Ⅲ的 γ 复合物有关。另一个复制蛋白 A(replication protein A,RPA)的作用相当于原核生物的 SSB。

9.3.2　DNA 复制

真核生物像原核生物细菌那样,复制也是双向进行,但细菌的复制速度要比真核生物快 20～50 倍。真核生物染色体含有比原核生物多 60 倍的 DNA,如果像原核生物那样从惟一的一个复制起点进行双向复制,需要的时间可能长达 1 个月以上。科学家通过电镜观察和放射自显影实验证实真核生物染色体存在许多复制起点,复制从每个起点双向进行,即染色体 DNA 是一部分一部分被复制的,每一部分被称之为复制子(replicon)。从电镜照片可看到正在复制的染色体存在许多复制"眼"(图 9.10)。

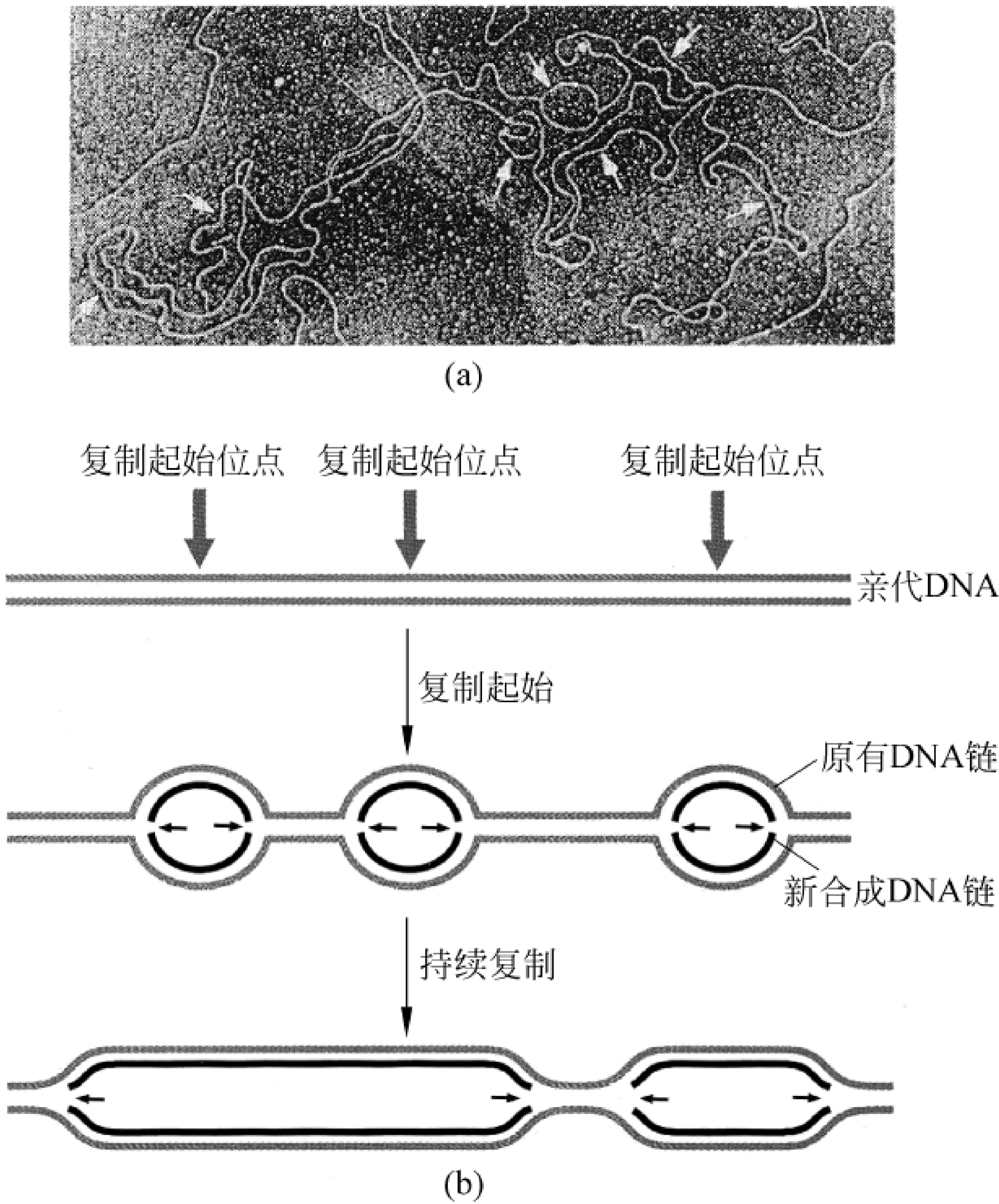


图 9.10　真核生物的 DNA 复制

(a) 正在复制的果蝇 DNA 的电镜照片,箭头所指为复制"眼";(b) 真核生物 DNA 复制的示意图,箭头所指为复制叉移动方向

到目前为止的研究表明，不同物种和组织每 3～300kb 就有一个复制起点，所以在数小时就可完成整个染色体 DNA 的复制，复制所需时间与原核生物在同一数量级。不过原核生物 DNA 复制有一个特点，即整个染色体 DNA 还没有复制完成之前就又从起始位点开始连续复制，但是真核生物染色体 DNA 在全部复制完成之前，不会从起始位点重新开始复制。

下面以酵母为例，描述真核细胞 DNA 复制起始的机制。复制起始发生在称为自主复制序列(autonomously replicating sequences，ARS)，该序列携带许多 11 碱基共有序列拷贝 5′TTTTATATTTT 3′。富含 AT 组成表明复制起始涉及起始点处双链解旋。

复制起始开始于一个称为起始点识别复合物(origin recognition complex，ORC)的多亚基蛋白质与 ARS 的 11bp 共有序列结合。这个蛋白复合物在整个细胞循环中始终与 DNA 结合，而且作为几种调控复制的蛋白质的附着位点。首先是复制激活蛋白(replication activator protein，RAP)Cdc6p 结合，然后是微染色体维持蛋白(mini-chromosome maintenance proteins，MCM)结合，形成预复制复合物(pre-replication complex，Pre-RC)(图 9.11)。MCM 蛋白是必需的复制起始因子，也称为复制许可因子(replication licensing factors，RLFs)，酵母至少含有 6 个不同的 RLFs。

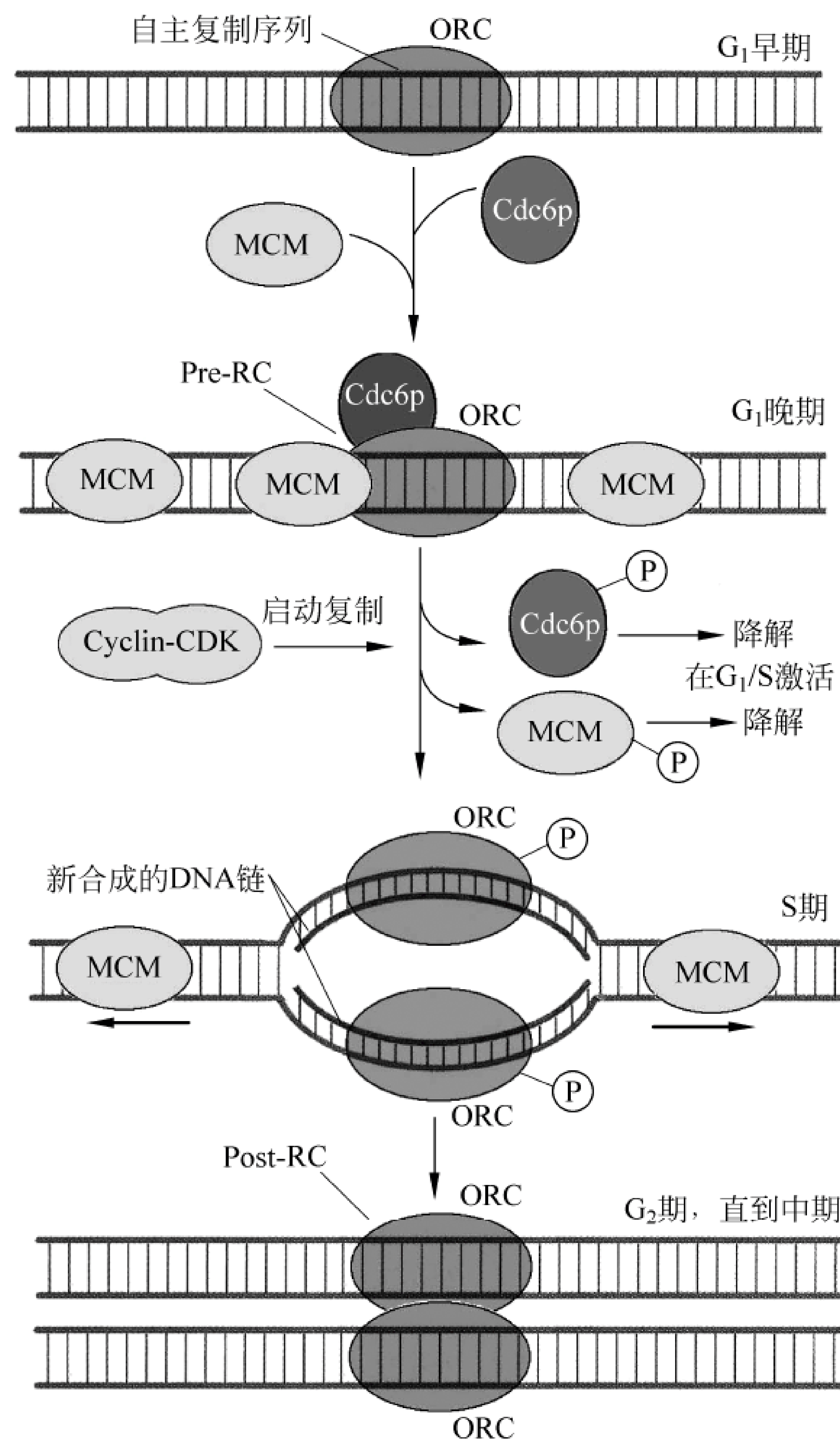


图 9.11 真核细胞 DNA 复制起始模式

在细胞循环过程中 ORC 始终存在于复制起点

形成Pre-RC还不能进行复制,起始复制还需要其他蛋白质和激酶,其中一个重要的蛋白质是刚好在S期之前浓度水平达到最高时的细胞周期蛋白(cyclin)。周期蛋白与细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases,CDK)结合形成Cyclin-CDK复合物,这个复合物触发DNA复制,同时也阻断了复制起始后一个Pre-RC的再组装。Cyclin-CDK复合物通过使Cdc6p、MCM和ORC磷酸化,磷酸化的Cdc6p和MCM脱离Pre-RC,并被降解掉。因此Cyclin-CDK复合物起着起动DNA复制和防止另一个Pre-RC形成的两个作用。

因此,磷酸化起着一个复制开关的作用,因为一旦Pre-RC中蛋白质被磷酸化(并被降解掉),就进入到复制后复合物(Post-RC)状态,这个状态下不能再起始DNA复制。这一转换能够确保每一真核细胞循环DNA复制只发生一次。

9.3.3 端粒与端粒酶

与原核生物的环状染色体DNA不同,真核生物的染色体DNA为线状,即每一条染色体DNA都是双链DNA分子,每一端都是由一段特殊序列组成,称为端粒(telomere)。线状DNA的末端在复制上出现一个需要解决的问题,即5′末端的合成问题(图9.12)。

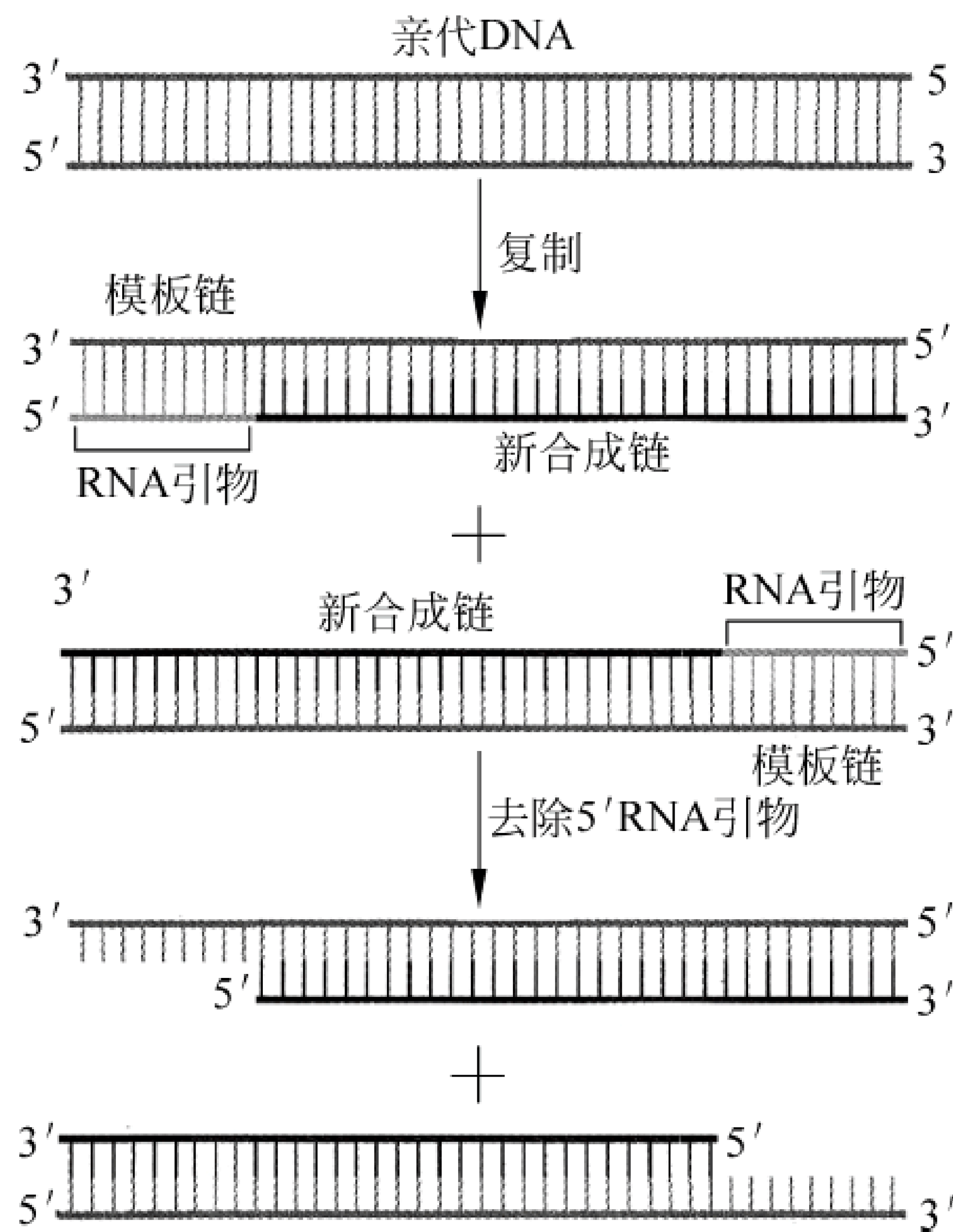


图9.12 染色体DNA末端的复制问题

染色体DNA复制时,新合成链的5′端含有一段RNA引物,当去除RNA引物后,每一轮新合成DNA的5′末端相对于前一代都缩短一段RNA引物长度

从图9.12图可看到,新合成的DNA的5′末端还存在一段与DNA模板的3′末端配对的RNA引物,不能被置换为DNA,因为DNA聚合酶催化5′→3′方向的聚合反应,而且只能在已存在的与模板链互补的RNA引物上进行延伸。如果不能完成末端RNA引物的置换,每一轮复制过后,新合成的DNA分子必将在两端缩短一个RNA引物的长度,最终会导致染色体DNA末端的必需遗传信息的缺失。

2009年度诺贝尔生理学及医学奖颁给了Eliazbeth H. Blackburn、Carol W. Greider和JackW. Szostak,他们的主要贡献是于1984年发现了含有RNA链的端粒酶(telomerase),

证明了端粒是由端粒酶合成的,解决了染色体末端 DNA 复制问题(图 9.13)。

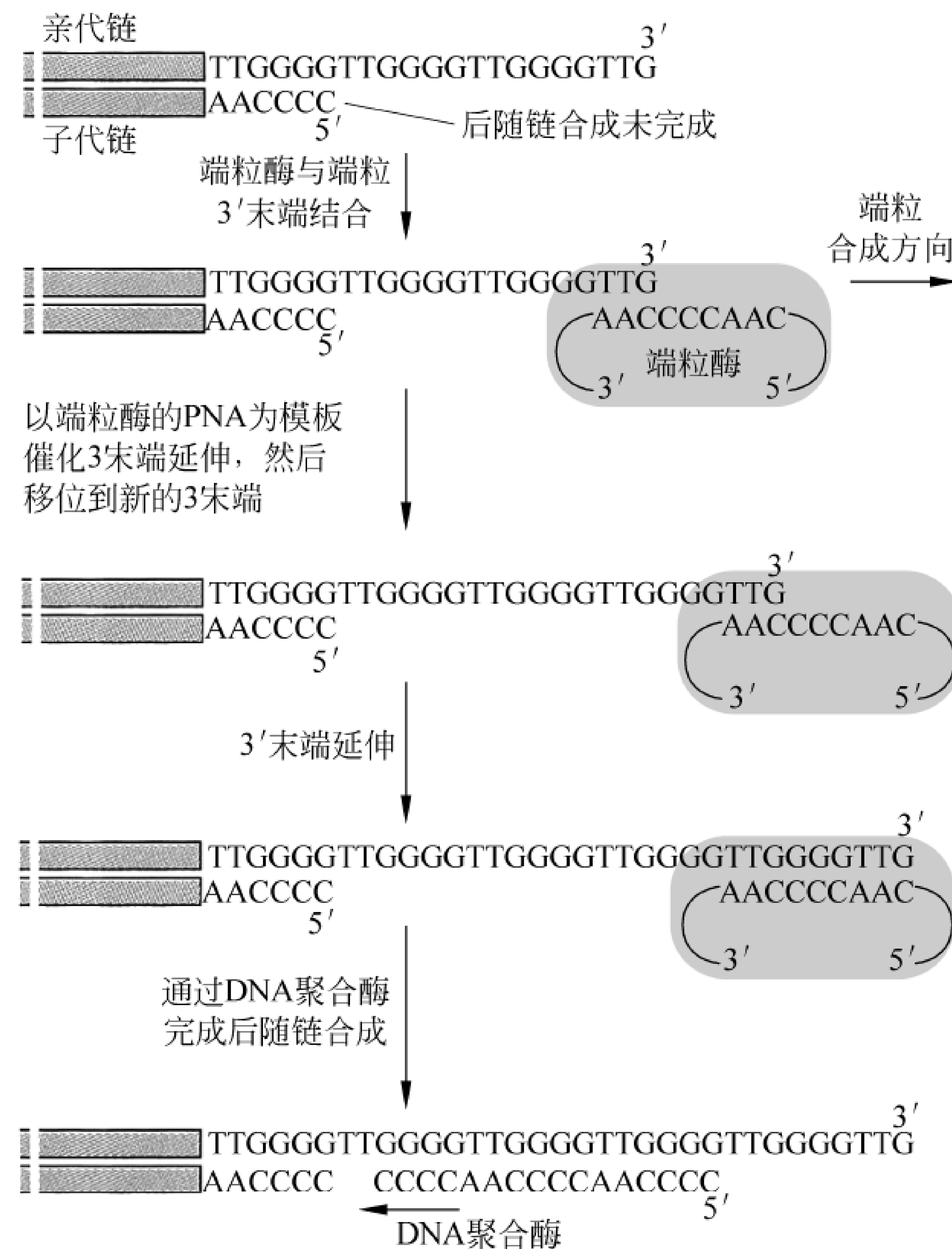


图 9.13 四膜虫端粒酶合成端粒 DNA 的机制

图 9.13 是以四膜虫端粒酶为例,说明端粒酶合成端粒 DNA 的机制。在四膜虫端粒 DNA 的 3′末端含有 TTGGGG(人的端粒为 TTAGGG)的重复序列,重复次数一般在 500 以上。端粒酶首先通过本身的 RNA 与端粒重复序列互补作用结合到端粒 DNA 上,然后以 RNA 为模板使端粒 DNA 3′末端延伸,在完成一段 DNA 合成后,端粒酶再移动到延伸的新的 3′末端,再进行端粒 DNA 3′末端的延伸反应,由于不断移位、延伸,可以添加许多端粒重复序列。

以新合成的 3′末端序列作为模板,由细胞的常规 DNA 复制“机器”(先合成 RNA 引物,然后再合成 DNA 序列)合成互补链的 5′末端 DNA 序列,达到互补链 5′末端的原有长度。

端粒酶也是一种 DNA 聚合酶,但它是一种 RNA 指导的 DNA 聚合酶,即一种以 RNA 为模板合成 DNA 的反转录酶。

9.4 其他复制方式

原核生物和真核生物中的 DNA 标准复制方式是从起始点开始,两个复制叉沿着两个相反方向移动,前导链和后随链模板都被复制下来,总的结果是半保留复制。除了标准复制机制外,还存在着其他的复制方式。

9.4.1 滚环复制

某些噬菌体的基因组形式是环状、单链DNA。以噬菌体φX174感染*E. coli*为例,病毒DNA的复制是以一种称为滚环复制(rolling-circle replication)方式进行的(图9.14)。

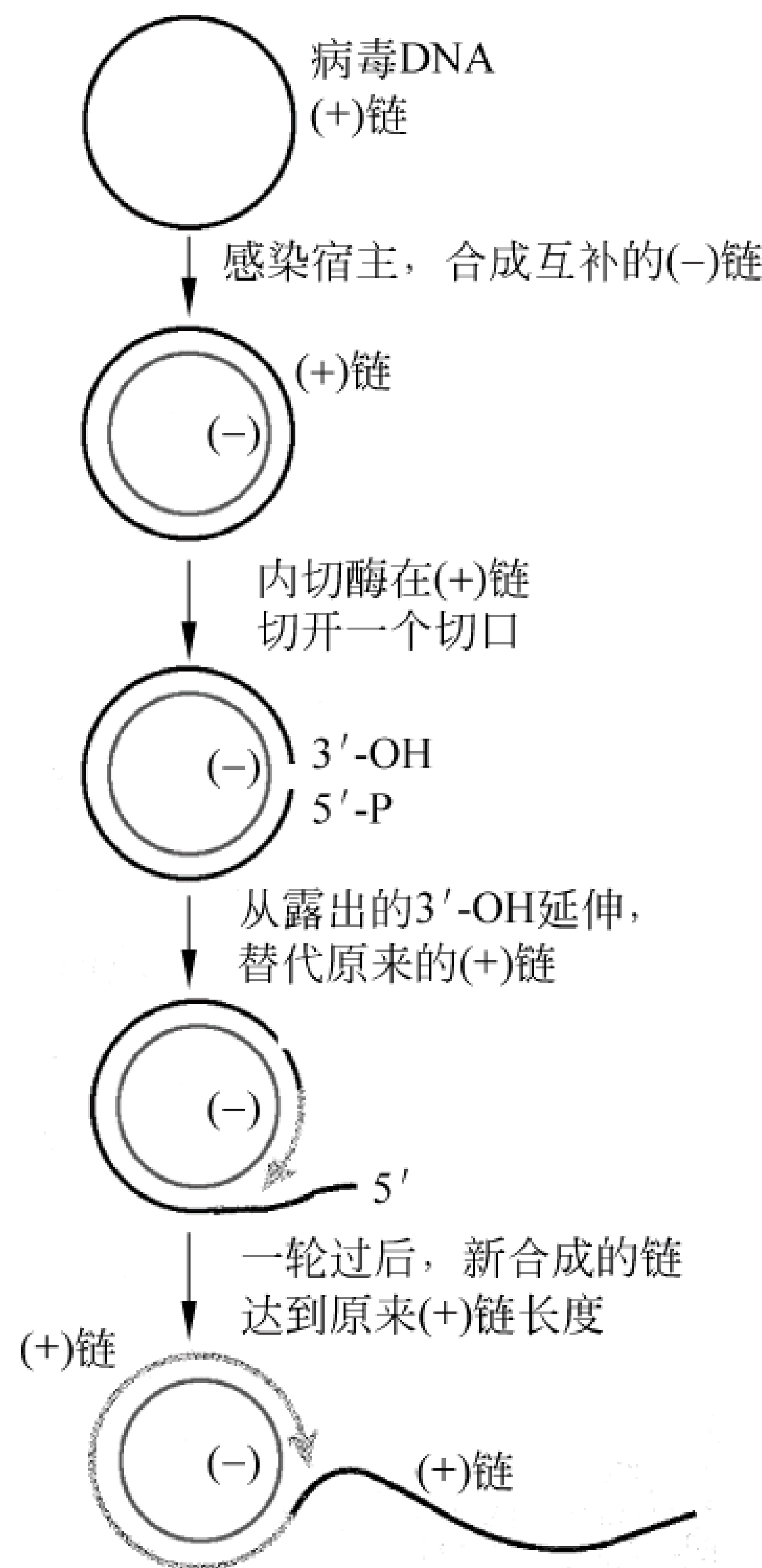


图9.14 噬菌体φX174 DNA滚环复制机制

当噬菌体DNA[称为(+)链]进入宿主细胞后,作为模板合成与它互补的反平行的环状链[称为(−)链],由此形成一个双链环状DNA分子,称为复制型(replicative form,RF)。然后一个噬菌体编码的内切酶在(+)链上特定部位制造一个切口,在DNA聚合酶Ⅲ作用下,(+)链从暴露出的3′羟基延伸,取代原来的(+)链,复制过程像是环在滚动。当合成一圈后,起始位点又暴露出来,内切酶再制造切口,进行下一轮的(+)链合成。游离出来的(+)链可以包装在噬菌体颗粒中。

9.4.2 D-环复制

线粒体DNA是环状双螺旋分子,它编码参与电子传递和氧化磷酸化的蛋白质以及其他一些线粒体蛋白质。线粒体DNA复制是一种起始很特殊的单向复制模式(图9.15)。

从图中可以看到,线粒体DNA有两个复制起点,分别用于每条子代链的合成。合成首先在前导链模板的复制起点开始,而且是单向进行的。随着前导链的合成,前导链取代后随链模板,形成了一个后随链模板取代环(D-环),这种复制模式被称为D-环复制。

当前导链合成完成2/3时,D-环通过并暴露出后随链模板复制的起点。此时开始后随链合成,合成方向与前导链合成方向相反,也是单向进行的。由于后随链复制推迟,所以当

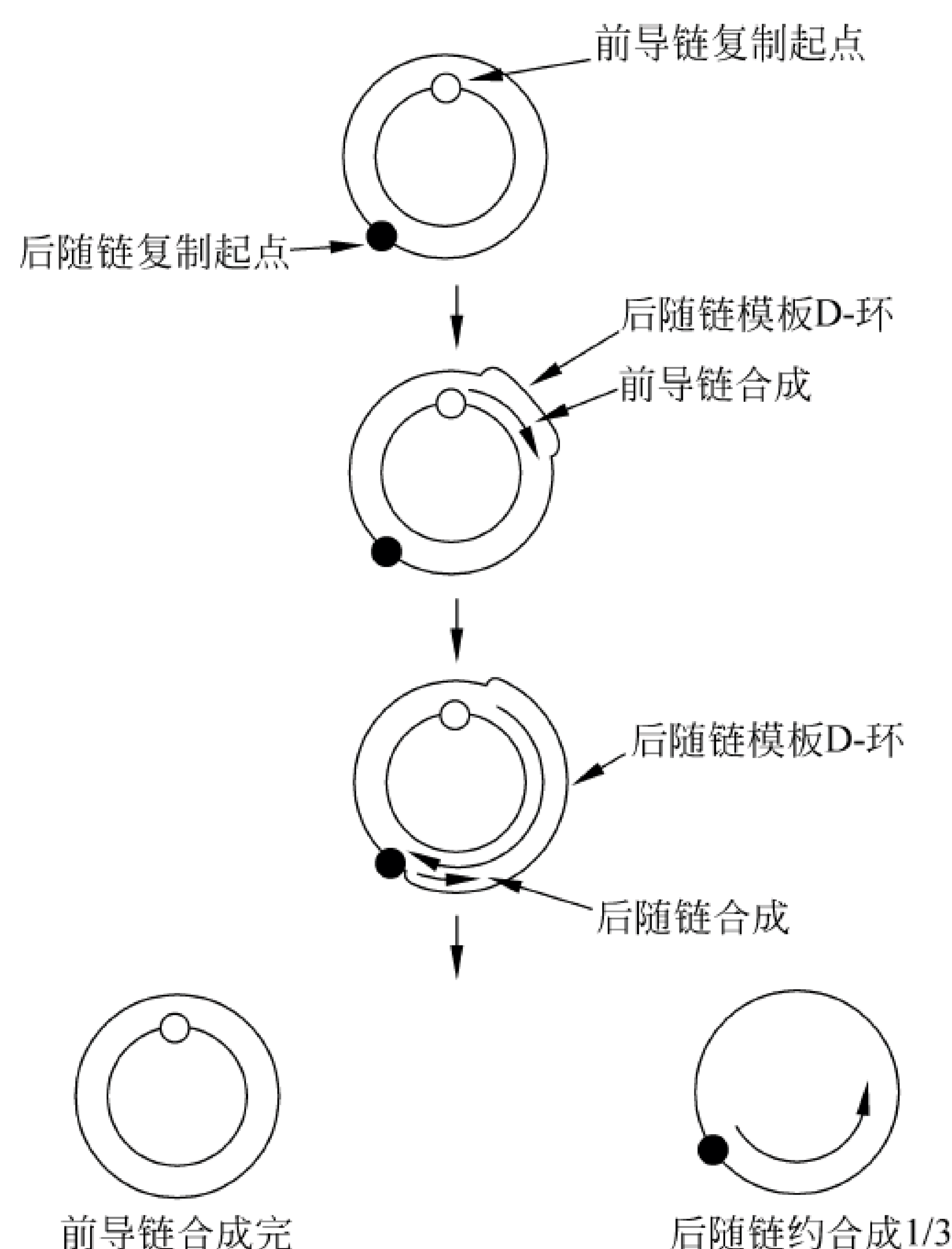


图 9.15 通过 D-环机制复制 DNA

前导链合成已经完成时，后随链合成才进行到 1/3。无论前导链还是后随链的合成都需要 RNA 引物，而且每条链合成都是在 DNA pol Ⅰ 催化下连续进行的。

9.5 DNA 修复

DNA 是细胞内惟一可以修复的大分子，这可能是 DNA 损伤的代价太严重的缘故。一个蛋白质被损伤，损失很小，因为蛋白质最终会被一个新的、有功能的蛋白质取代。如果 DNA 被损伤，整个生物体可能处于危险状态，因为指导一个必需生物分子合成的遗传信息可能被永久地改变了。在细菌中，对一个编码必需蛋白的基因的未修复损伤是致死的。即使在多细胞生物中，DNA 中缺陷过多积累可能会导致细胞功能的逐渐混乱。可以说 DNA 修复机制不仅保护单个细胞，而且也保护了下一代。

DNA 的损伤和突变之间是有区别的。DNA 损伤有多种形式，包括碱基修饰、核苷酸删除和插入、DNA 链的交联及磷酸二酯键骨架的断裂。发生在体内的许多 DNA 损伤是可以修复的。只有逃过修复的损伤才会造成突变，突变是对 DNA 核苷酸序列的可遗传的变化，因此突变是遗传信息的永久性改变。

就像 DNA 复制那样，我们了解的大多数 DNA 修复机制都是来自对 *E. coli* 的研究结果。然而近来真核生物 DNA 修复的研究、酵母基因的初步分析以及人疾病的基因研究已经揭示了在这些生物中也存在类似 *E. coli* 的修复过程。

下面简单介绍 *E. coli* 中存在的 5 种基本类型 DNA 修复系统：直接修复、核苷酸切除修复、碱基切除修复、错配修复和同源重组修复。

9.5.1 直接修复

对于有的DNA损伤,生物体不切断DNA或切除碱基,而是直接实施修复,这样的损伤修复机制称为直接修复(direct repair)。例如DNA损伤之一的胸腺嘧啶二聚体的形成可以通过直接修复机制修复。

由于紫外线和离子辐射会诱导同一条链上相邻胸腺嘧啶之间形成环丁基环,即形成胸腺嘧啶二聚体(图9.16)。这种二聚体使得碱基配对结构扭曲,造成DNA损伤,影响复制和转录。在原核生物中存在一种光复活酶(photoreactivating enzyme),也称光解酶(photolyase),它结合在胸腺嘧啶二聚体部位,在可见光存在下,光复活酶使胸腺嘧啶二聚体解离,直接恢复到胸腺嘧啶单体形式。

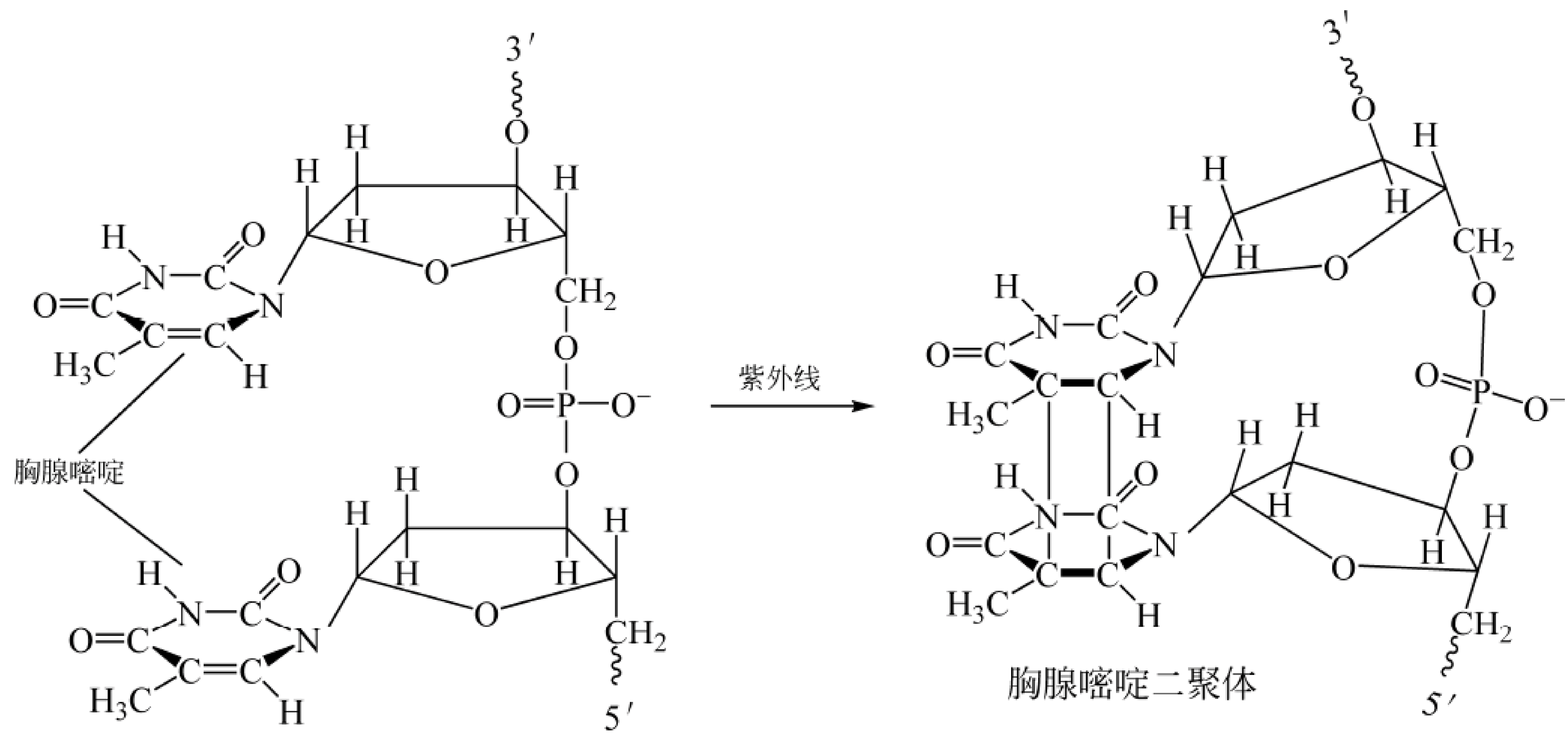


图9.16 胸腺嘧啶二聚体的形成

另外一个直接修复的例子是甲基转移酶(methyltransferase)修复被烷化剂损伤的DNA。在真核生物和原核生物中都存在这种转移酶。

由于烷化剂作用会使鸟嘌呤甲基化,结果在复制过程中会造成胸腺嘧啶代替鸟嘌呤传到子代。O^6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶将甲基鸟嘌呤的甲基转移到该酶上的一个半胱氨酸残基的巯基上,不需要切除核苷酸而直接恢复为鸟嘌呤(图9.17)。接收了甲基后转移酶失活,不能再催化其他甲基转移反应。但甲基化的转移酶作为一个转录的调节物又可刺激该转移酶基因的表达,所以根据需要可以生产更多的修复酶。

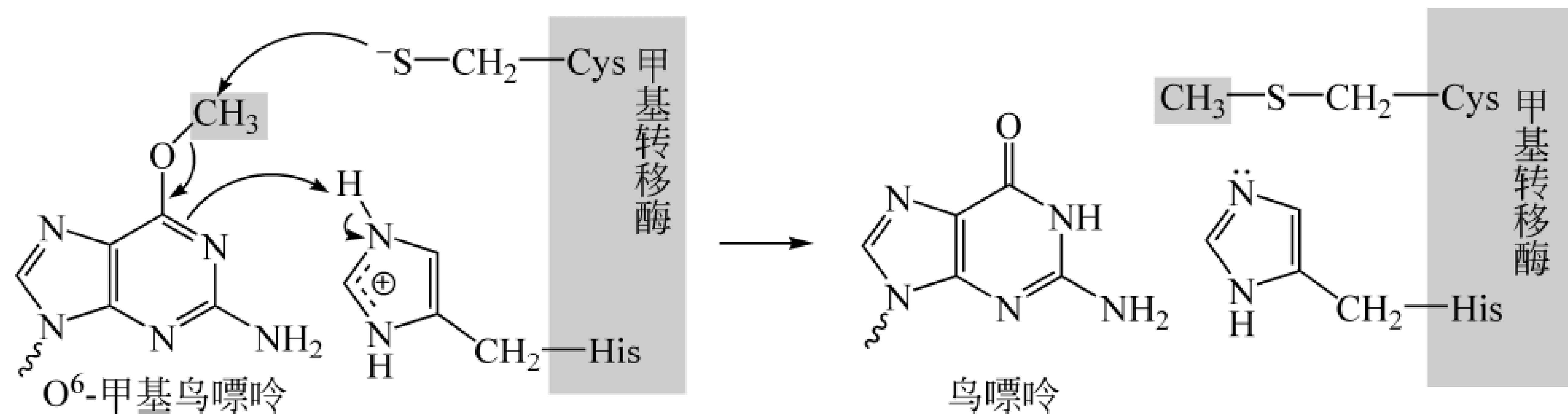


图9.17 直接修复

9.5.2 核苷酸切除修复

像形成胸腺嘧啶二聚体那样的损伤也可以通过核苷酸切除修复(nucleotide excision repair)系统修复(图 9.18)。修复系统中的主要酶是由基因 *uvr*A、*uvr*B 和 *uvr*C 分别编码的 3 个亚基组成的,所以该酶又称为 ABC 切除核酸酶(ABC excinuclease)。

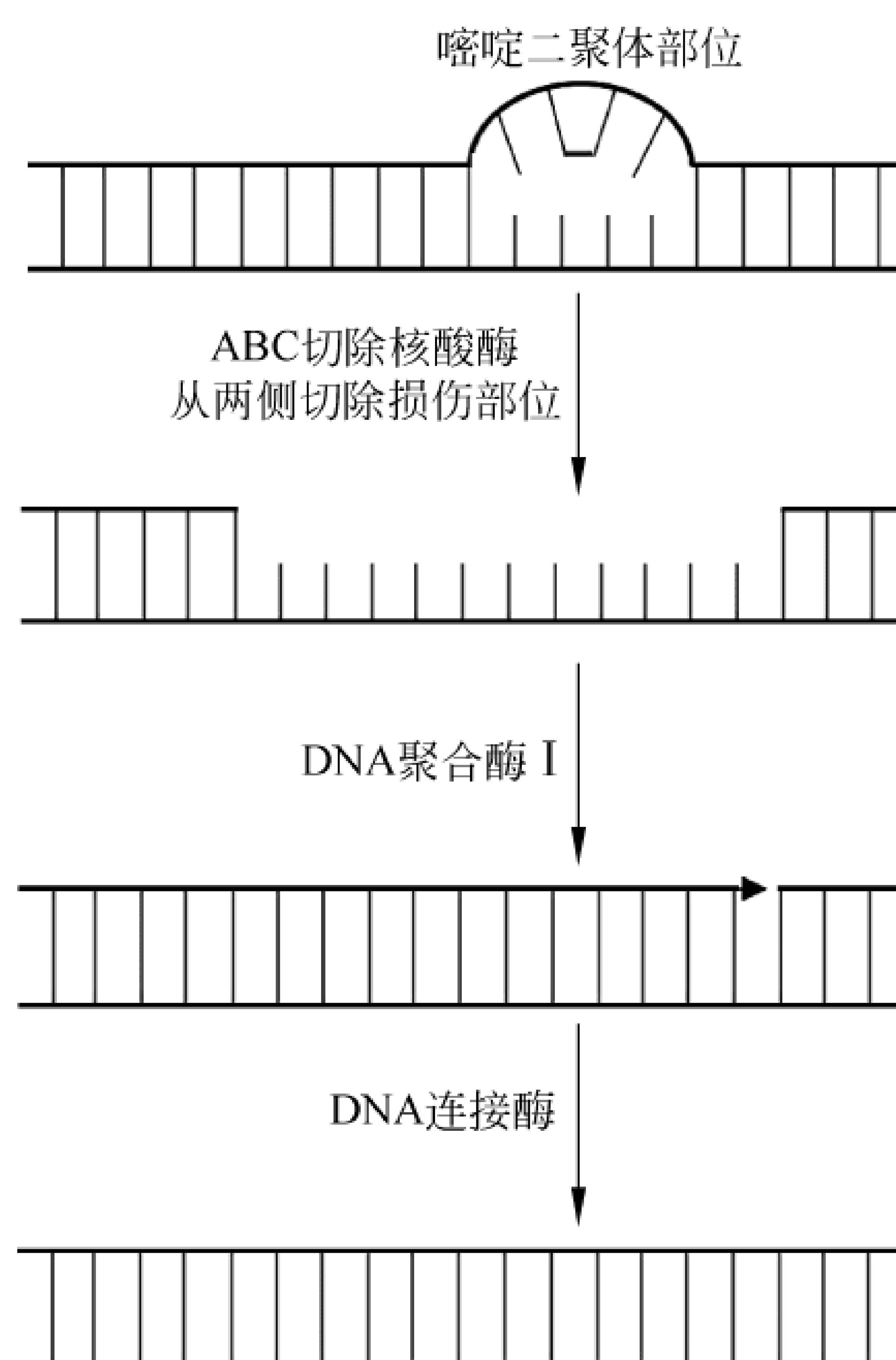


图 9.18 核苷酸切除修复

首先,ABC 切除核酸酶从二聚体 5′侧上游第 7 个和 3′侧下游第 4 个磷酸二酯键处将含有嘧啶二聚体的 DNA 片段切除,结果出现一个缺口。然后在 DNA 聚合酶 Ⅰ 的催化下按照互补链填充缺口,但填充的最后一个核苷酸的 3′端和相邻的未切除的核苷酸 5′端仍有一个切口。最后切口通过 DNA 连接酶连接,完成修复。

9.5.3 碱基切除修复

胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤分别经化学诱变剂,例如亚硝酸盐脱氨可形成尿嘧啶、次黄嘌呤和黄嘌呤那样的不正确碱基,造成 DNA 损伤。DNA 糖基化酶(DNA glycosylase)能识别并通过切断相应的 N-糖苷键切除这些不正确碱基。切除结果在 DNA 中制造了脱嘌呤或脱嘧啶的位点,这样的位点通常称为"无碱基"位点或 AP[apurinic (无嘌呤)或 apyrimidinic (无嘧啶)]位点。通常每种 DNA 糖基化酶对一种类型的碱基损伤特异,例如尿嘧啶糖基化酶就可以除去由于胞嘧啶脱氨形成的尿嘧啶,形成一个 AP 位点。然后,AP 内切核酸酶(AP endonuclease)切去含有 AP 位点的脱氧核糖-5-磷酸,出现一个核苷酸空隙。再在 DNA 聚合酶 Ⅰ 作用下重新放置一个正确的核苷酸,最后通过 DNA 连接酶将切口封闭,这样的修复方式称为碱基切除修复(base excision repair)(图 9.19)。

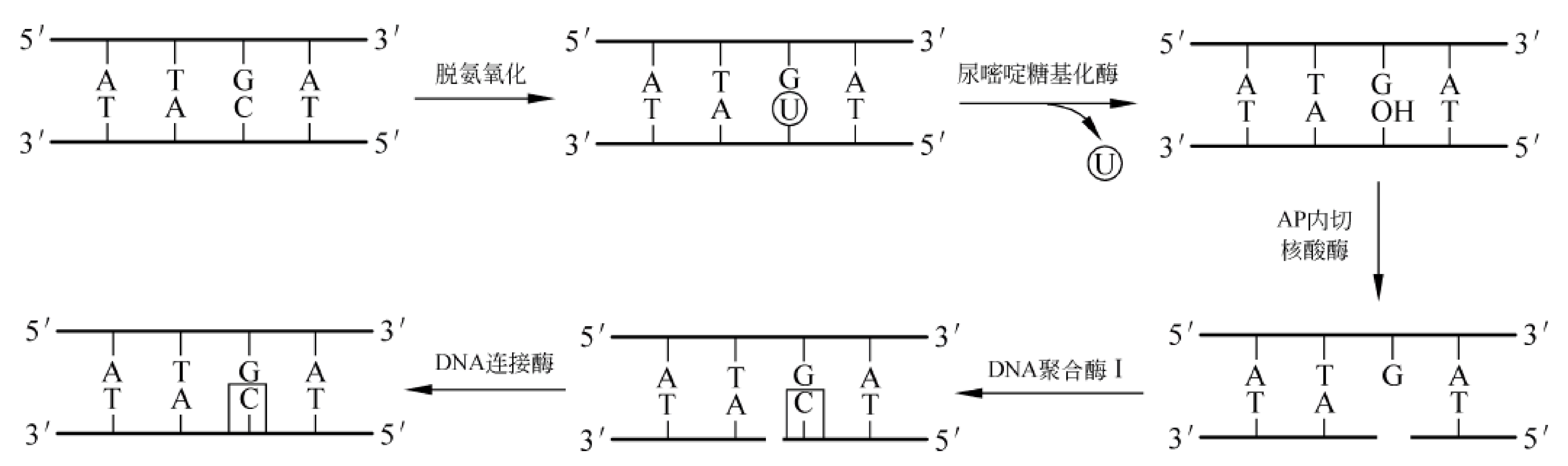


图 9.19 碱基切除修复

相关话题 为什么 DNA 不含尿嘧啶?

RNA 的构件分子为 4 种核糖核苷酸,DNA 为 4 种脱氧核糖核苷酸,RNA 中含 A、G、C 和 U 4 种碱基,而 DNA 中除含有与 RNA 相同的 A、G 和 C 3 种碱基外,第 4 种碱基不是 U,而是由 U 经复杂途径合成的 T(胸腺嘧啶)。T 和 U 具有相同的碱基配对性质,都与 A 配对:A∶T,A∶U,为什么细胞非要费劲合成 T 呢?

究其缘故,就是由于 C 易于自发脱氨或与亚硝酸盐反应脱氨后转变为 U,所以 DNA 才选择 T。如果 U 是 DNA 的正常碱基,碱基切除修复机制无法辨别脱氨形成的 U 是来自 G∶C→G∶U,还是来自 A∶U? 然而,由于 T 是一个正常的 DNA 碱基,DNA 中根本不存在 A∶U,那么 DNA 中出现的 U 肯定是 C 脱氨产物,就会被尿嘧啶糖基化酶切除,再通过碱基切除修复机制换上一个正确的脱氧核苷酸。

尽管亚硝酸盐具有潜在的诱变活性,但在肉类食品(例如香肠)制作中,仍然用作防腐剂,因为它可抑制肉毒杆菌在肉类食品中生长。

9.5.4 错配修复

DNA 复制过程中偶然的错误会导致新合成的链与模板链之间的错误碱基配对。这样的错误可以通过 *E. coli* 中的 3 个蛋白质(MutS、MutH 和 MutL)校正,这样的修复方法称为错配修复(mismatch repair)。该修复系统只能校正新合成的 DNA,其主要依据是新合成的链中 GATC 序列中的 A(腺苷酸残基)开始未被甲基化。GATC 中 A 甲基化与否常用来区别新合成的子链(未甲基化)和模板链(甲基化)。这一区别很重要,因为修复酶需要识别两个核苷酸残基中的哪一个是错配的,否则如果将正确的核苷酸除去就会导致突变。

图 9.20 按照 1～4 过程说明了 MutS、MutH 和 MutL 3 种蛋白质是如何校正新合成子链中的一个错配碱基。

(1) 同源二聚体 MutS 识别并与错配碱基对(G-T)结合。

(2) 依次结合同源二聚体 MutL 以及 MutH,MutS 利用 ATP 水解能量从两个方向将 DNA 拽出直至修复开始部位。然后 MutHLS 复合物沿着两个方向移动直至碰到最近的

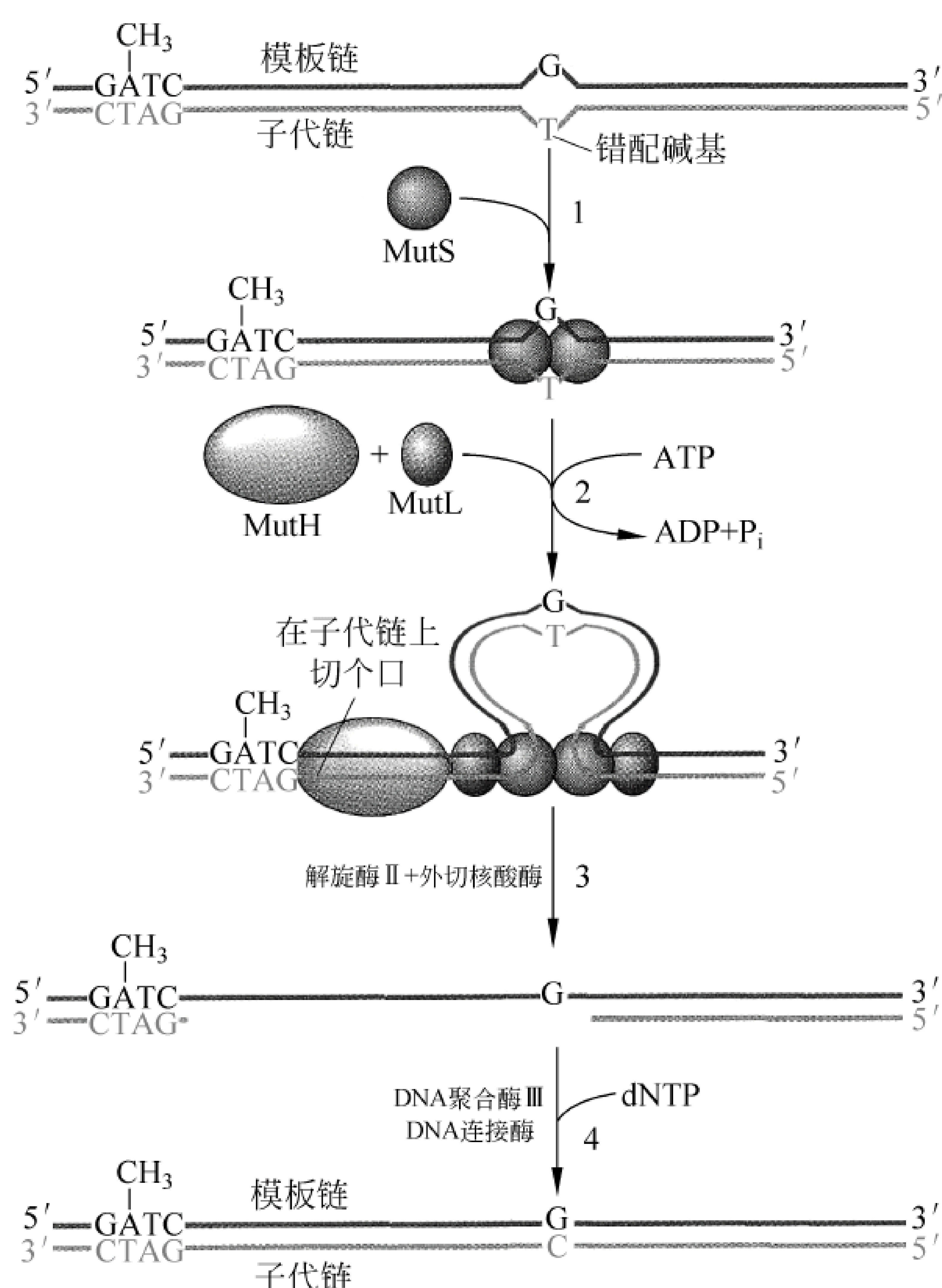


图 9.20 错配碱基修复

GATC 序列,MutH 的内切酶活性在未甲基化的 G 的 5′侧切口。

(3) 解旋酶Ⅱ将 DNA 解旋,一直到错配部位,然后外切核酸酶切去包括错配碱基 T 在内的单链序列。

(4) 出现的缺口在聚合酶Ⅲ全酶和 DNA 连接酶催化下填充和连接。

9.5.5 重组修复

前面已经描述了胸腺嘧啶二聚体造成 DNA 损伤,影响复制,可以通过光复活酶或核苷酸直接切除修复。如果这两种修复系统存在缺陷,细菌还有重组修复系统。当亲代链含有损伤部位(TT 二聚体),复制时 DNA 聚合酶接近损伤部位就会停止合成相应子代链,在新合成的子代链中会留下缺口,此时重组修复就非常有效。图 9.21 给出了发生在大肠杆菌中的一种缺口重组修复过程。

从图 9.21 看到,在复制叉停止时,产生了两个子代双链:一个是含有一条未受损伤的亲代链和新合成子代链,另一个是由带有损伤部位的亲代链和新合成至损伤处的子代链构成。在重组作用蛋白 RecA(DNA 链转移蛋白)启动两个同源双链之间交换,使曾经与损伤亲代链互补的另一条亲代链与它重新形成双链。除了 RecA 外,还需要重组作用蛋白 RecF、RecO 和 RecR 以及单链结合蛋白(SSB)参与。转移结果在先前未损伤链出现了缺口,但由于它对面存在一条新合成的子代链,所以可以在 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶作用下填补

缺口。虽然没有修复损伤部位,但可使复制继续进行,而损伤部位由后续的切除系统来修复。

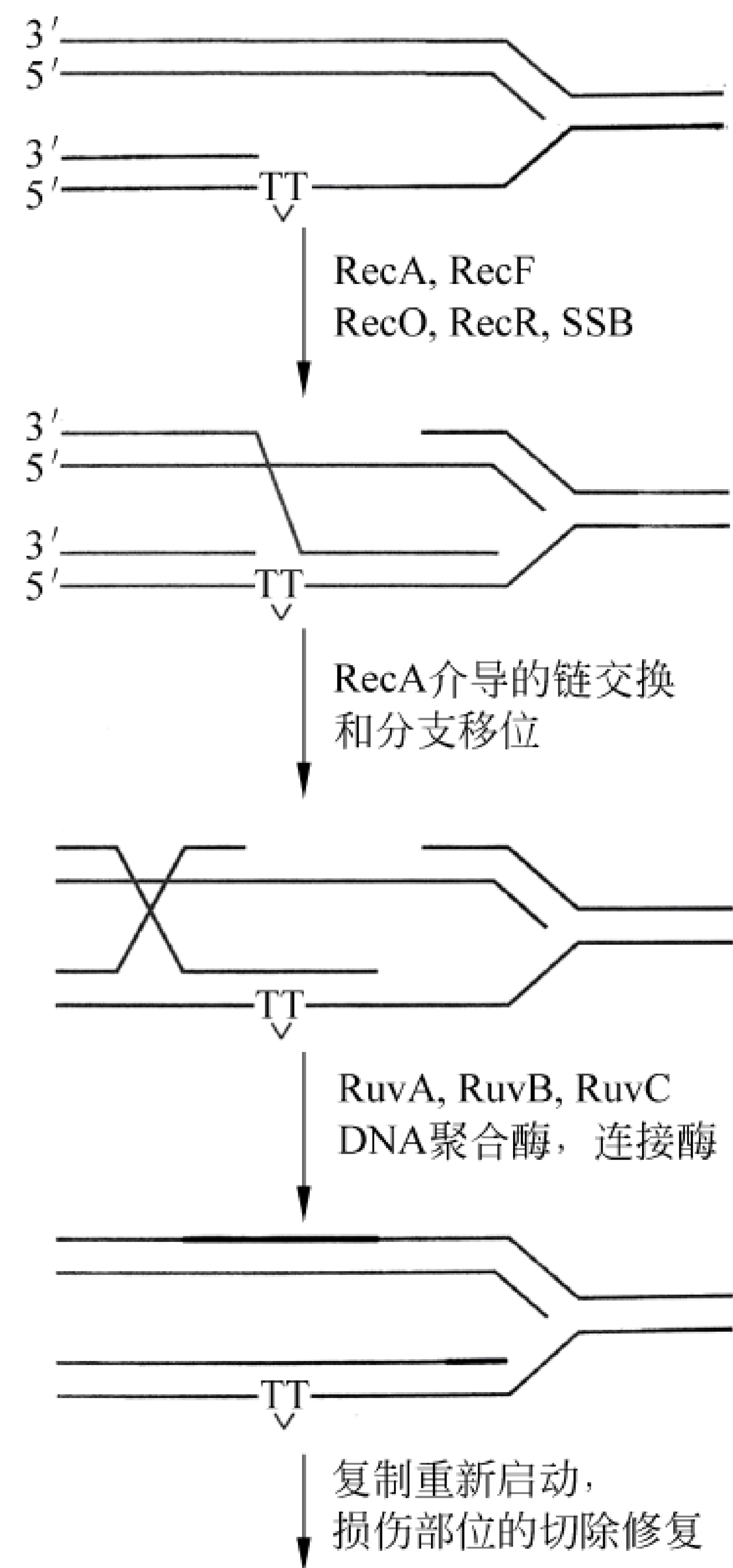


图 9.21　子链缺口的重组修复

RecA 催化同源双链之间链交换以及分支迁移,未损伤 DNA 母链转移到子链中
DNA 聚合酶无力复制而形成的缺口,在 DNA 聚合酶和连接酶作用下填补缺口

重组是否成功最关键的一步是解开链交叉形成的 Holliday 衔接点(Holliday junction),还需要识别衔接点的 RuvA 蛋白、解旋酶 RuvB 蛋白和能切开衔接点的核酸内切酶 RuvC。

相关话题　着色性干皮病

着色性干皮病(xeroderma pigmentosum,XP)是一种隐性遗传病,XP 患者对光十分敏感,阳光照射的皮肤部位会出现大量黑色色素斑点,有可能导致致命性的皮肤癌。原因已经研究得比较清楚,XP 患者的 DNA 修复系统出了问题。

前面讲到紫外线和离子辐射会诱导同一条链上相邻胸腺嘧啶之间形成胸腺嘧啶二聚体,造成 DNA 损伤,影响复制和转录。细菌可通过自身的光复活酶使胸腺嘧啶二聚体解离,修复损伤部位。人没有光复活酶,但人体内存在核苷酸切除修复系统,该修复系统是修复因紫外线照射形成的胸腺嘧啶二聚体的惟一途径。然而由于 XP 患者体内缺少核苷酸切除修复系统,不能修复紫外线照射损伤的 DNA 片段,所以患致命性皮肤癌的风险就比常人高得多。

当然常人如果过度暴露于阳光之下,即使有健全的 DNA 修复系统,也会有部分损伤不能

完全修复，因此紫外线导致的 DNA 损伤仍有患皮肤癌的危险。除了皮肤癌因核苷酸切除修复缺失所致之外，另一个比较普遍的例子是结肠癌，据统计约有 15% 的结肠癌是由于编码参与错配修复的蛋白质的基因发生突变引起的。例如，一种常见的遗传性非息肉性结肠癌（HNPCC）就是因错配修复缺陷引起的。显然人类某些癌症与 DNA 修复系统有关。

9.6 反转录

反转录（reverse transcription）是相对于转录而言的，具体来说转录是以 DNA 为模板在 RNA 聚合酶催化下合成 RNA 的过程，而反转录是以 RNA 为模板在反转录酶（reverse transcriptase）催化下合成 DNA 的过程。反转录酶是一种特殊的聚合酶，具有 RNA 指导的 DNA 聚合酶、核糖核酸酶 H（RNase H）和 DNA 指导的 DNA 聚合酶的活性。

反转录酶是 1970 年由 Howard Temin 和 David Baltimor 各自独立在 RNA 病毒中检测到的，并证明在该酶催化下可以由 RNA 合成 DNA，后来人们便将那些含有反转录酶的 RNA 病毒统称为反转录病毒（retrovirus）。例如引起获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的人类免疫缺陷病毒（HIV）就是一种反转录病毒。反转录酶负责将进入宿主细胞的病毒 RNA 反转录为双链 DNA，双链 DNA 再整合到宿主细胞的染色体 DNA 中。反转录酶也需要引物，该引物是来自前一次感染中获得的宿主细胞 tRNA 分子，它的 3′端在起始 DNA 合成的部位与病毒 RNA 模板序列配对，以 tRNA 游离的 3′-OH 为起点开始 DNA 合成。

图 9.22 给出了实验室中由一个特定组织提取的 mRNA 为模板在反转录酶催化下合成 cDNA 的过程。首先以与 poly（A）配对的 poly（T）作为引物合成与 mRNA 互补的 DNA

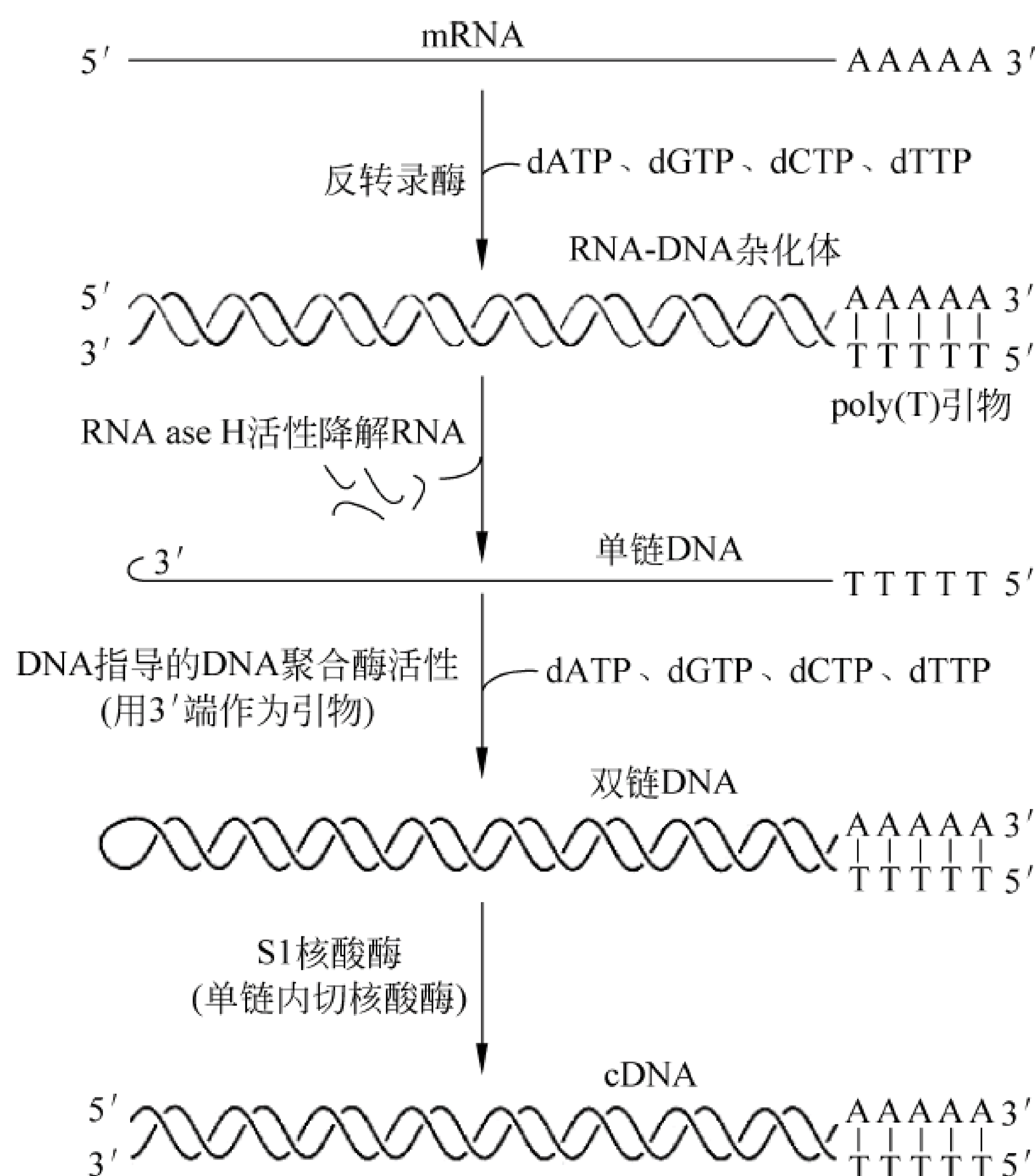


图 9.22 由病毒 RNA 反转录为 cDNA

链,形成RNA-DNA杂合双链。接下来核糖核酸酶H将杂合双链中的RNA降解,然后DNA指导的DNA聚合酶以没有降解的DNA链为模板(3′端作为引物)合成另一条互补的DNA链,生成双链DNA,最后再经S1核酸酶切割生成互补DNA(complementary DNA,cDNA)。

反转录酶已经成为基因工程中的一个特别有用的工具酶,由于在体外可以利用反转录酶由mRNA合成cDNA,cDNA可用来表达相应结构基因编码的目的蛋白。

9.7 转基因动物

基因转移技术中一个令人兴奋的新进展是能够通过转染(transfection)将基因引入动物中。转染定义为质粒DNA被注射或被吸收进受体细胞。已经获得这一新遗传信息的动物定义为转基因动物,所以转基因动物就是携带外源基因的动物。

转基因技术涉及将携带感兴趣基因的质粒注射到卵母细胞或受精卵的细胞核中,然后再将受精卵植入雌性动物子宫等技术环节。显微注射是最常用且成功率较高的方法,例如用携带编码大鼠生长激素(rGH)基因转染制作的转基因小鼠(图9.23)。经鉴定,10%左右由注射卵发育的小鼠已经携带了整合到单一一个染色体部位的转染基因。然后这个基因就像一个正常基因那样通过转染小鼠的后代遗传下去。这些小鼠中生长激素的水平是正常小鼠的数百倍,个头几乎是正常小鼠的两倍。转染的生物技术已经扩展到饲养动物,例如转基因鸡、牛、猪、兔、绵羊,甚至连转基因鱼也生产出来了。

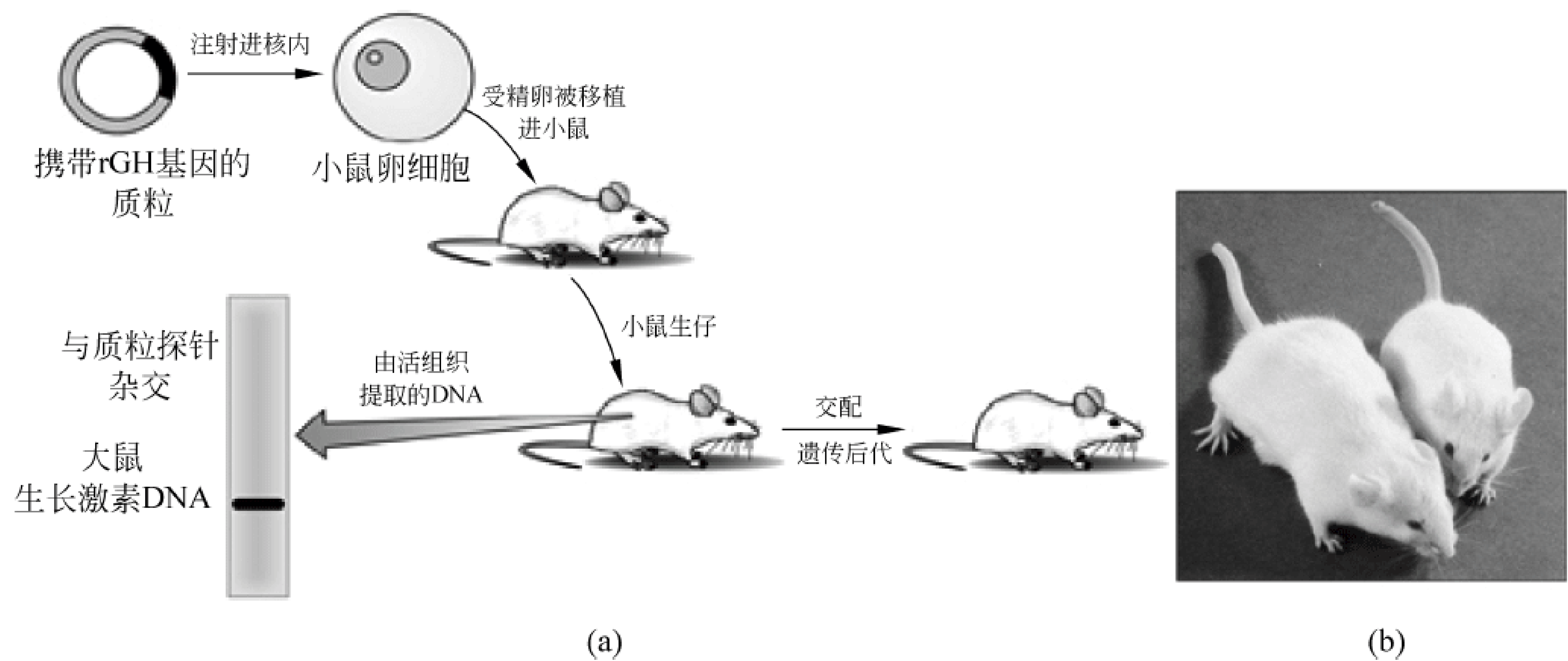


图9.23 转基因小鼠的生产

(a) 通过显微注射法制作转基因小鼠。将携带大鼠生长激素基因的质粒注射入小鼠卵母细胞或受精卵,然后植入代孕母鼠中。通过DNA印迹法确认存在大鼠生长激素DNA。(b) 左侧为携带大鼠生长激素的转基因鼠,个头是右侧正常鼠的两倍

第一个由体细胞克隆的动物是克隆绵羊Dolly,代表了克隆技术的里程碑。随后成功的例子是将编码凝血因子Ⅸ(治疗血友病)的基因整合到绵羊中。用因子Ⅸ基因转染绵羊胚成纤维细胞,然后将转染细胞的细胞核转移到剔除了细胞核的绵羊卵母细胞中。接下来将这些转基因卵母细胞移植到绵羊子宫中,产下转基因小羊羔。这个引入因子Ⅸ的转基因经特殊设计,能够在转基因绵羊的奶中生产因子Ⅸ蛋白质。这种转基因技术在奶牛也取得了类

似的成功，奶牛能够生产更多的奶，这实际上为任何蛋白质进入到商品生产带来可能性。

另外，通过转染技术可以用功能基因替换动物中缺陷基因，实施基因治疗也很有前途。

小结

1. DNA 复制是半保留方式，每条 DNA 链都可作为模板用于互补链的合成。复制产物子代双链由一条亲代链和一条新合成的子代链组成。DNA 复制是双向的，即从一个起点向两个方向进行。

2. DNA 聚合酶通过催化核苷酸基转移反应将核苷酸加到生长的 DNA 链上。DNA 合成按照 5′→3′方向进行。DNA 合成中的错误可以通过聚合酶的 3′→5′方向外切酶活性除去。有些 DNA 聚合酶含有额外的 5′→3′外切酶活性。

3. DNA 的前导链连续合成，但滞后链通过产生冈崎片段过程不连续合成。前导链和每个冈崎片段的合成都是从 RNA 引物开始。在 *E. coli* 中，通过 DNA 聚合酶Ⅰ除去 RNA 引物，并用 DNA 取代。最后通过 DNA 连接酶将滞后链的两个分开片段连接起来。

4. 组装在复制叉处参与复制的蛋白质复合体称为复制体。复制体包含两个 DNA 聚合酶分子和辅助蛋白质，例如解旋酶和引发酶。

5. 复制体的组装确保 DNA 的两条链同时合成。在 *E. coli* 中解旋酶将亲代 DNA 解旋，SSB 与单链结合。通过复制体使滞后链的模板成环，以便两条链按照与复制叉移动相同的方向进行合成。

6. DNA 复制的起始发生在特殊的 DNA 序列（例如在 *E. coli* 中 *oriC*），依赖于其他辅助蛋白。在细菌中，DNA 复制的终止也是发生在特殊部位，也需要一些辅助蛋白。

7. 真核生物 DNA 的复制类似于原核生物，但真核生物染色体含有多个复制起点，而且冈崎片段小。由于存在核小体，真核生物中复制叉的移动要比原核生物慢。

8. 由于辐射或化学试剂导致的 DNA 损伤（如胸腺嘧啶二聚体）可以通过直接修复系统修复。复制过程中出现的碱基错配可通过错配修复系统修复。而复制中出现的子代链缺口可通过缺口重组修复系统修复。

9. 反转录是以 RNA 为模板在反转录酶催化下合成 cDNA 的过程。反转录酶具有 RNA 指导的 DNA 聚合酶、核酸酶 H 和 DNA 指导的 DNA 聚合酶的活性。反转录首先形成 RNA-DNA 杂化双链，然后降解掉 RNA 链，再以保留下来的 DNA 链合成其互补链，最后形成 cDNA。

10. 几种新的技术，例如 PCR 和 DNA 测序都是建立在 DNA 复制的基础上的。

习题

1. 在 Meselson-Stahl 进行的 DNA 复制方式实验中，经过 4 个世代后，双链都是“重链”，双链都是“轻链”以及杂化 DNA 的比率各是多少？

2. 将 α-磷酸上标记^{32}P 的 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 加入到 *E. coli* 可溶性提取液中，温育一段时间。然后用三氯乙酸处理混合液，使 DNA 沉淀，但脱氧核苷三磷酸不沉淀。分析沉淀的放射性强度可以测定由前体合成 DNA 的量。

(a) 如果去掉4种脱氧核苷三磷酸中的任一种,沉淀物中能否测出放射性?

(b) 如果4种脱氧核苷三磷酸中只标记dTTP,沉淀物中能否测出放射性?

(c) 如果不在α-磷酸上标记,而是在脱氧核苷三磷酸的β-磷酸基或γ-磷酸基上标记^{32}P,沉淀物中能否测出放射性?

3. *E. coli* 中的DNA复制使用的引物是RNA,而不是DNA,这对DNA复制的忠实性有什么影响?

4. 预测下列 *E. coli* 基因的缺失是否致死?(a)*dnaB*(编码DnaB);(b)*polA*(编码DNA聚合酶I);(c)*ssb*(编码单链结合蛋白);(d)*recA*(编码RecA)。

5. 某细菌的染色体是一个有5.2×10^6bp的环状、双链DNA分子。染色体含有一个复制起点,复制叉移动的速度为1000个核苷酸/s。

(a) 计算复制该染色体所需的时间。

(b) 实际上该细菌在最适条件下繁殖一代可缩短至25min。请解释。

6. 果蝇的整个基因组由1.65×10^8bp对组成。如果单个复制叉复制的速度为30bp/s,计算在下列起始条件下,复制整个基因组所需的时间。

(a) 惟一一个双向起点。

(b) 2000个双向起点。

(c) 在早期胚胎阶段速度最快,只需约5min,此时必需的起始点至少要多少个?

7. 如果端粒酶活性丧失将会对DNA合成有什么影响?

8. (a)在体外DNA合成反应中加入SSB(单链结合蛋白),通常会增加DNA产率,解释原因;(b)体外DNA合成反应一般在65℃条件下进行,通常采用从生长在高温环境下细菌分离出的DNA聚合酶,这有何好处?

9. 甲磺酸乙酯(EMS)是一个活性烷化剂,它可使DNA中鸟嘌呤残基的O_6乙基化。如果这一修饰的G没有被切除和用正常的G取代,那么一轮DNA复制的结果是什么?

10. 给出两个用于修复 *E. coli* 中嘧啶二聚体的两个方法。

11. 为什么高突变率常出现在含5-甲基胞嘧啶的DNA区域?

12. 为什么在聚合酶链式反应(PCR)中要严格控制温度,而且要使用耐高温的DNA聚合酶呢?

13. 描述在下列情况下链终止测序的结果。

(a) 加的ddNTP量过少;(b) 加的ddNTP过多;

(c) 加的引物过少;(d) 加的引物过多。

10　转录与 RNA 加工

Watson 和 Crick 于 1953 年提出 DNA 双螺旋结构模型以后，紧接着又提出了 DNA 的半保留复制方式，并被后来的实验所证实。各种生物通过这种方式将遗传信息从一代传给下一代，但 DNA 的核苷酸序列是如何被转换为具有功能的蛋白质的仍然是个待解的谜。

在 20 世纪 40 年代，George Beadle 和 Edward Tatum 根据面包真菌粗糙脉孢菌（*neurospora crrsa*）模型实验的结果发现一个特定的遗传单位（基因）携带生成特定酶的信息，这就是人们熟知的“一个基因一个酶”理论，DNA 和酶（蛋白质）之间的“信使”应当是 RNA。按照 1958 年 Francis Crick 提出的分子生物学中心法则（central dogma of molecular biology）假说，遗传信息转移的主流是：DNA→RNA→蛋白质，其中 DNA→RNA 称为转录（transcription），RNA→蛋白质称为翻译（translation），显然 RNA 是 DNA 和蛋白质之间的信息载体。不存在蛋白质→RNA，或蛋白质→DNA 的途径（图 10.1）。

转录也称为 RNA 合成（RNA synthesis），以 DNA 为模板，但只是 DNA 中的某一条链。作为模板的这条链称为模板链（template chain），也称为反义链（antisense chain），而互补链称为编码链（coding strand），也称有义链（sense chain），所以转录是不对称转录（图 10.2）。下面将先描述原核细胞中的转录，然后概述真核细胞中转录。

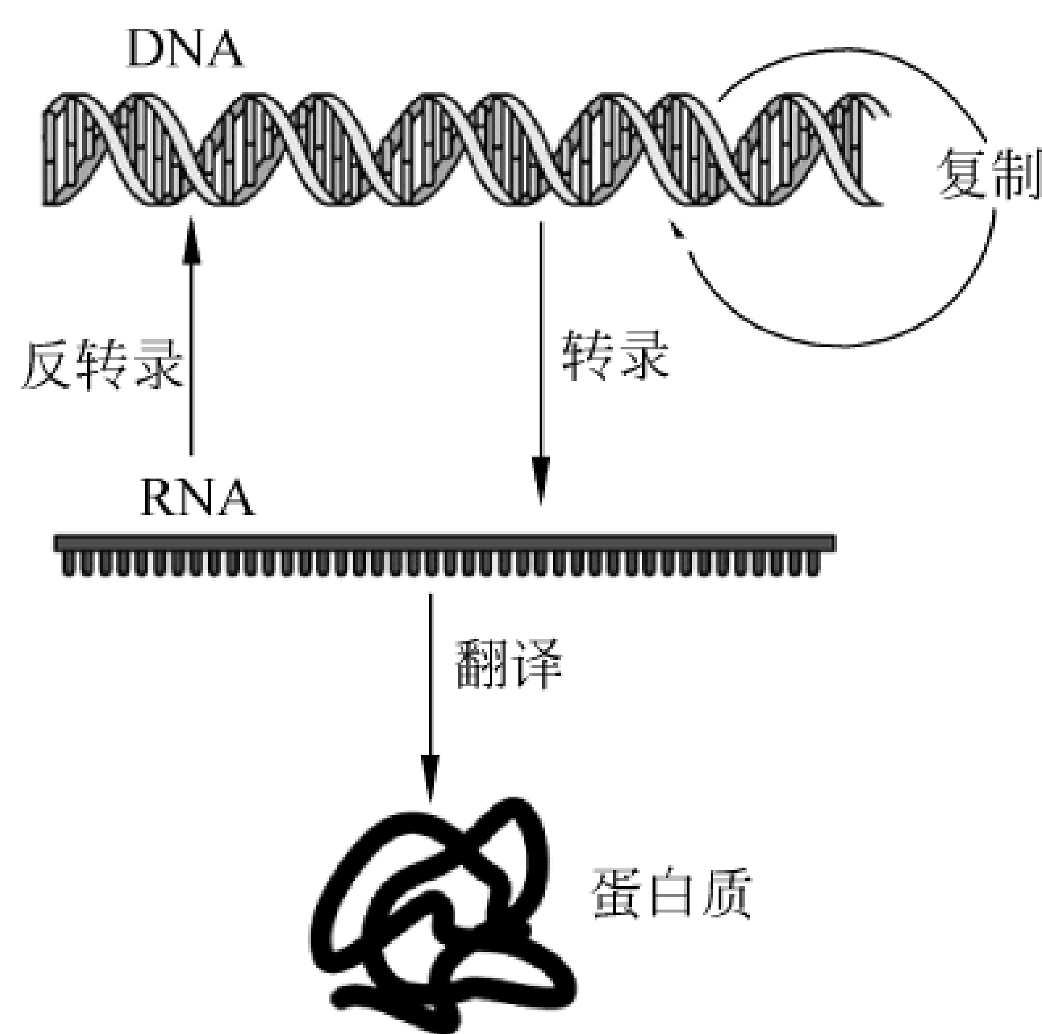


图 10.1　分子生物学中心法则

详细的信息转移主流：DNA→RNA（转录），RNA→蛋白质（翻译），RNA→DNA（反转录），此外还包括 DNA 和 RNA 本身的复制

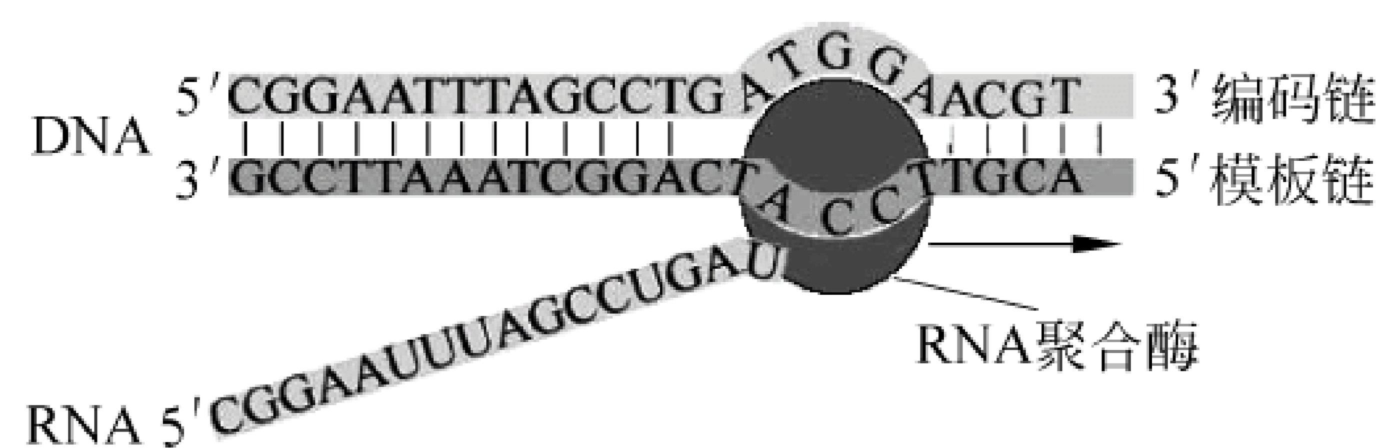


图 10.2　转录

RNA 合成与 DNA 复制非常类似，也需要一个聚合酶执行转录任务，但该聚合酶是以 DNA 为模板合成 RNA 的聚合酶，所以称为 DNA 指导的 RNA 聚合酶（RNA polymerases，

RNA pol)。在整个转录期间,合成的RNA链的延伸方向也是5′→3′。但DNA和RNA合成之间存在几个重要的差别:①RNA是由核糖核苷酸合成的,而不是脱氧核糖核苷酸;②在RNA合成中,尿嘧啶取代胸腺嘧啶碱基与腺嘌呤碱基配对;③RNA合成不需要预先存在的引物;④RNA合成的选择性非常强,只有基因中很小的一部分被转录。

10.1 聚合酶和启动子

E. coli 只有一种RNA pol,当将高度纯化的酶样品经变性凝胶电泳分析时,可清晰看到5条带(5个不同多肽链),表10.1给出了RNA pol亚基组成和功能。

表10.1 *E. coli* RNA pol全酶的亚基组成

亚基	M_r	功 能
α	36 500	转录起始,与调节蛋白和上游启动子元件相互作用
β	151 000	转录起始和链延伸
β′	155 000	结合DNA
σ	70 000	识别启动子
ω	11 000	可能参与调节

RNA pol全酶亚基组成为$\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$,其中$\alpha_2\beta\beta'\omega$为实际承担核苷酸聚合反应的核心酶。σ亚基(又称σ因子)识别控制基因转录的启动子序列,启动转录。一旦RNA合成开始,σ亚基就脱离核心酶。RNApol全酶很大,以至于在电镜下就能清晰看到(图10.3)。

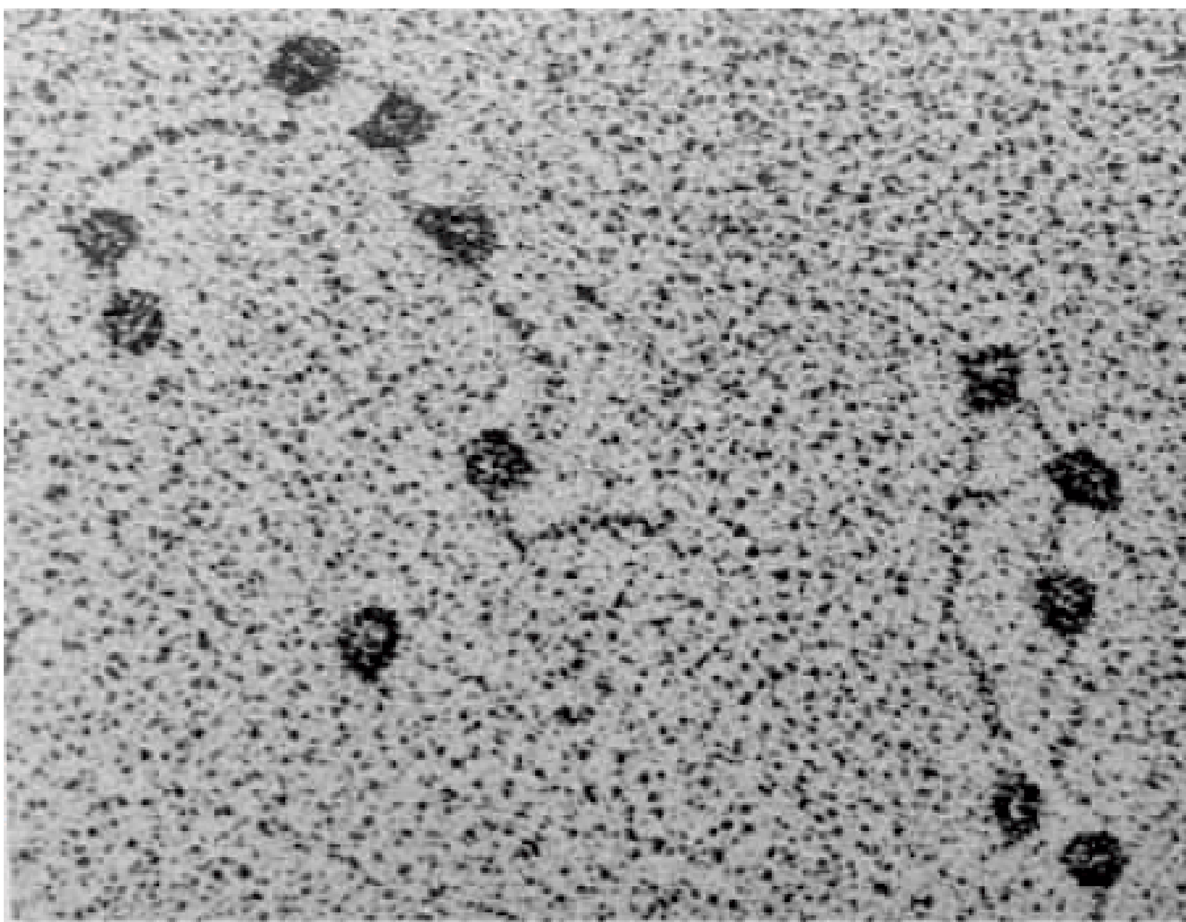


图10.3 *E. coli* RNA pol全酶电镜照片

(来源:Williams,R. C. ,*Proc. Natl. Acad. Sci.* ,1977,74:2317)

这是一个已知的最大的RNA pol全酶,可结合噬菌体T7DNA的不同启动子

启动子是原核生物操纵子(operon)中控制基因转录的调控序列。操纵子特指在原核生物基因组中由共表达的结构基因以及调控它们表达的操纵基因和启动子序列组成的转录单元(图10.4),而结构基因指的是一些功能相关串联排列在一起的基因。转录生成的mRNA称为多顺反子mRNA(polycistronic mRNA),顺反子(cistronic)是基因(gene)的同义词。操纵子概念不适合真核生物,因为在真核生物转录只生成单顺反子mRNA(monocistronic mRNA)。

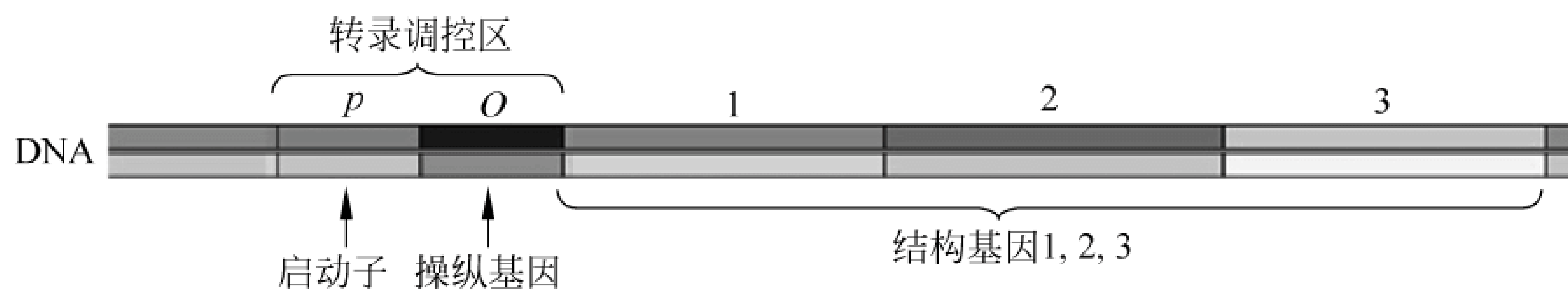


图 10.4 操纵子的一般结构

调控区由启动子 P 和操纵基因 O 组成，而结构基因包括串联排列在一起的 1 基因、2 基因和 3 基因

启动子是位于转录起始位点 5′端上游约 40 个碱基的编码链上的一段 DNA 序列，图 10.5 给出了作为原核生物启动子的范例，被主要的 σ^{70} 亚基（右上角 70：M_r 为 70kD）识别的启动子序列。转录起始位点处的核苷酸定为＋1，位于起始位点上游的核苷酸都按负号“－”排序。

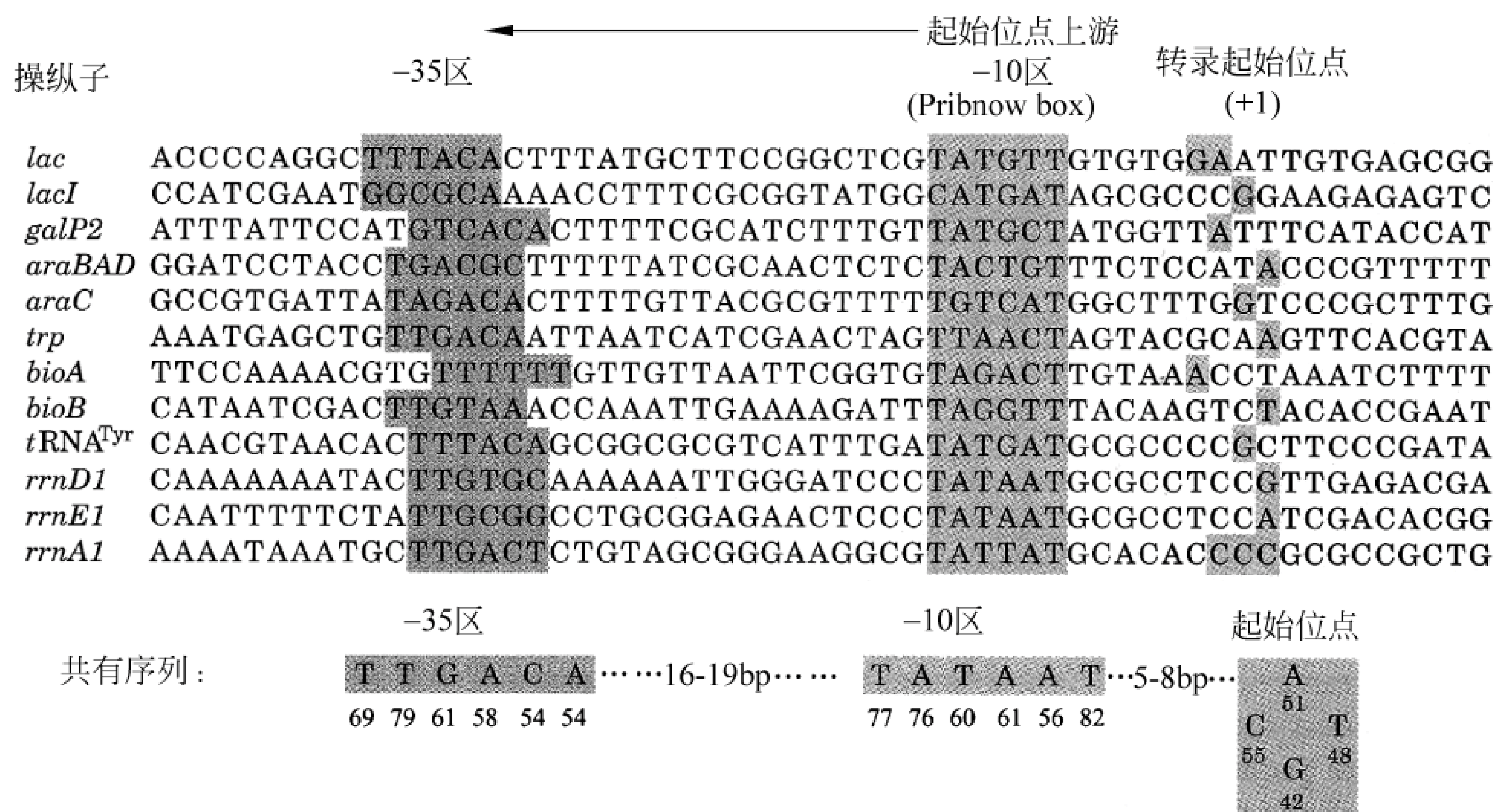


图 10.5 *E. coli* 一些代表性启动子的核苷酸序列（编码链）

起始位点（＋）的上游－10 左右和－35 左右的 6 个碱基对序列都是保守的，下面一行是 *E. coli* 298 个启动子的共有序列，核苷酸下方的数字是它们出现的百分比

从图 10.5 可看到转录起始位点上游分布着一个－10 区（也称为 Pribnow box，David Pribnow 首先提出）和一个－35 区，比较这些启动子的这两个区域，发现含有许多相同的核苷酸，每个短序列在不同启动子中都很相似，－10 区的共有序列是 TATAAT，而－35 区的是 TTGACA。共有序列区富含 A-T 碱基对，2 个氢键的 A-T 碱基对与 3 个氢键的 G-C 碱基对相比更易于解旋。－10 区和－35 区正是 σ 因子识别和 RNA 聚合酶结合启动子的序列，不同的 σ 亚基识别不同类型启动子的共有序列。

相关话题　DNA 足迹法

DNA 足迹法（DNA footprinting）是一种广泛用于确定特定蛋白质结合 DNA 的核苷酸序列，例如上述 RNA 聚合酶全酶结合的启动子－10 区和－35 区序列就是通过该技术确

定的。

首先将特定蛋白质与在一端做了放射性标记的,确信含有蛋白结合序列的DNA溶液温育,然后将切割DNA试剂,例如脱氧核糖核酸酶(DNAase Ⅰ)加到DNA:蛋白质复合物溶液中,DNAase Ⅰ酶切没有蛋白质结合的暴露出的DNA骨架,对照溶液样品中除了不加特定蛋白质外,其他条件与测试样品一样,一端也是做了放射性标记的,确信含有蛋白结合序列的DNA和DNAase Ⅰ。DNAase Ⅰ降解产物都是带有5′-磷酸末端的片段。

然后将经DNAase Ⅰ降解的两个样品的降解产物通过凝胶电泳分析,可以看出来自DNA:蛋白质复合物的一套标记片段与来自裸DNA的一套片段相比,缺少了某些片段。缺少片段区域正是特定蛋白质结合DNA的核苷酸序列区域(图10.6)。蛋白结合的准确位置和序列可以通过直接测定含足迹的同一凝胶上的序列带获得。

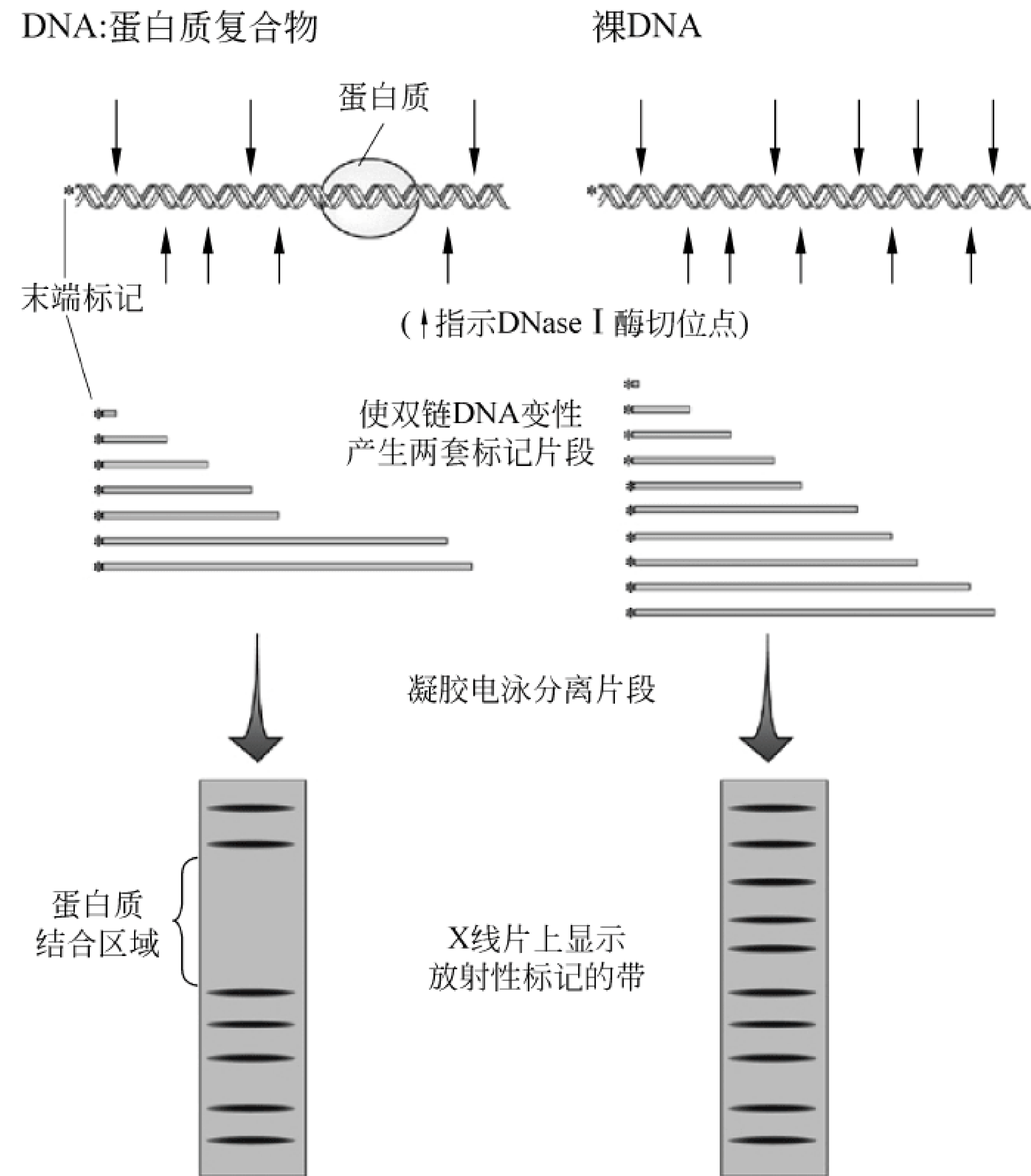


图10.6 DNA足迹法

双链DNA中的一条链(非模板链)进行放射性标记

(来源:Rhods D, Fairall L,1997)

10.2 转录起始和延伸

当σ亚基识别启动子序列,RNA pol全酶与启动子首先形成闭合启动子复合物,然后全酶使转录起始位点的约14bp(−12至+2)解旋,形成非常稳定的开放启动子复合物(图10.7)。

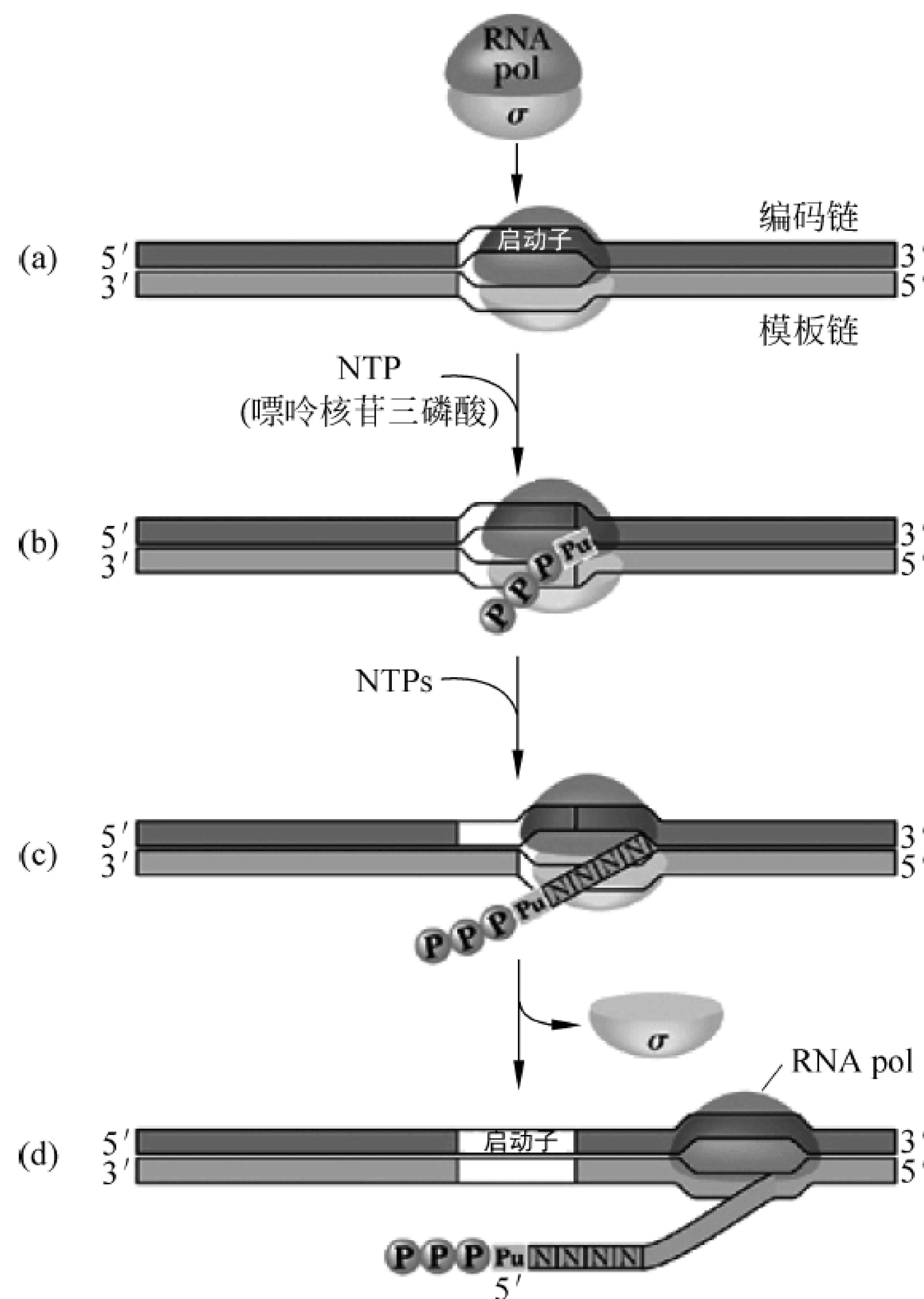


图 10.7　原核生物的转录起始和延伸

(a) RNApol 全酶的 σ 识别启动子,DNA 解旋,形成开放启动子复合物;(b) RNA pol 起始 RNA 的合成;(c) RNA 聚合酶全酶催化 RNA 的延伸;(d) 当合成了 9-12 核苷酸后,σ 亚基与 RNA pol 分离,RNA pol 继续合成 RNA 的其余部分

RNA pol 含有两个结合核苷三磷酸(用 NTP 表示)的部位:起始部位和延伸部位。起始部位优先结合嘌呤核苷酸 ATP 或 GTP,而大多数 RNA 的 5′端都开始于嘌呤核苷酸。第一个核苷酸通过与开放启动子复合物内暴露出的+1 碱基进行碱基配对结合到酶中的起始部位。第二个核苷酸通过与+2 碱基配对进入到酶中的延伸部位。然后第一个核苷酸 3′-氧对第二个核苷三磷酸的 α-磷进行亲核攻击形成一个磷酸酯键,两个核苷酸连接起来,并释放出焦磷酸,焦磷酸水解为无机磷酸释放能量,保证反应进行。

RNA pol 沿着模板链移动到下一个碱基处,准备接收下一个核苷酸。一旦合成的寡核苷酸长度达到 9~12 个残基后,σ 从 RNA pol 上脱离,转录起始完成,RNA pol 沿着 5′→3′方向继续进行 RNA 转录延伸反应(图 10.8)。

随着 RNA 链的延伸,合成的 RNA 链离开模板,已打开的 DNA 又恢复双螺旋。通过 *E. Coli* RNA 聚合酶催化的延伸速率约是 30 个核苷酸/s。由于许多 RNA 聚合酶可依次附着在基因的启动子上,所以该基因可以连续地被转录,会出现转录的 RNA 由长到短一系列 RNA 链悬挂在 DNA 模板链上的景象。

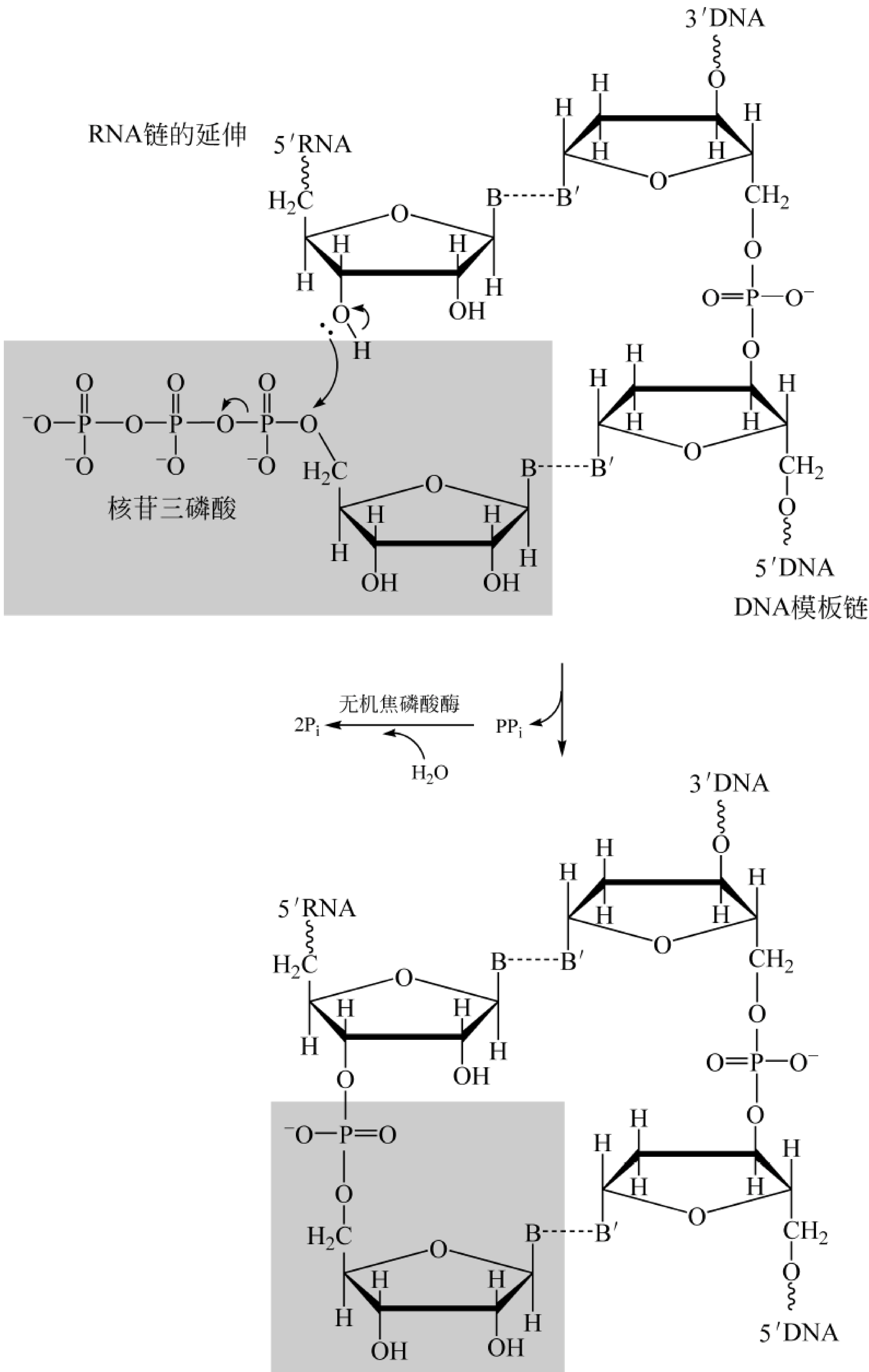


图 10.8 RNA 聚合酶催化的延伸反应

当待掺入的核苷三磷酸与 DNA 模板链上下一个未配对的核苷酸正确配对后,通过生长着的 RNA 链的 3′羟基对待掺入的核苷三磷酸的 α-磷攻击,RNA 聚合酶催化磷酸二酯键形成,并释放出焦磷酸。焦磷酸水解驱动反应进行

图中 B′和 B 分别代表 DNA 和 RNA 链上的碱基,┈┈代表配对碱基之间的氢键

10.3 转录终止

原核生物中存在着两种转录终止机制，一种是受终止位点特殊序列控制的内在终止，另一种是 ρ 因子依赖性终止。

1. 内在终止

内在终止是由 DNA 中称为终止位点的特殊序列决定的。在该段序列中含有富含 G-C 碱基对的反向重复序列，经转录后 RNA 链内碱基配对可形成稳定的茎-环（“发卡”）。模板链中存在的 6～8 个连续的 A 碱基编码转录物 3′端的一串 U。发卡结构形成使 RNA 聚合酶停止移动，模板链和 RNA 转录物之间比较弱的 A-U 碱基对被更稳定的模板链和编码链之间形成的 A-T 碱基对取代，转录终止，新合成的 RNA 从 DNA 上自发分离（图 10.9）。

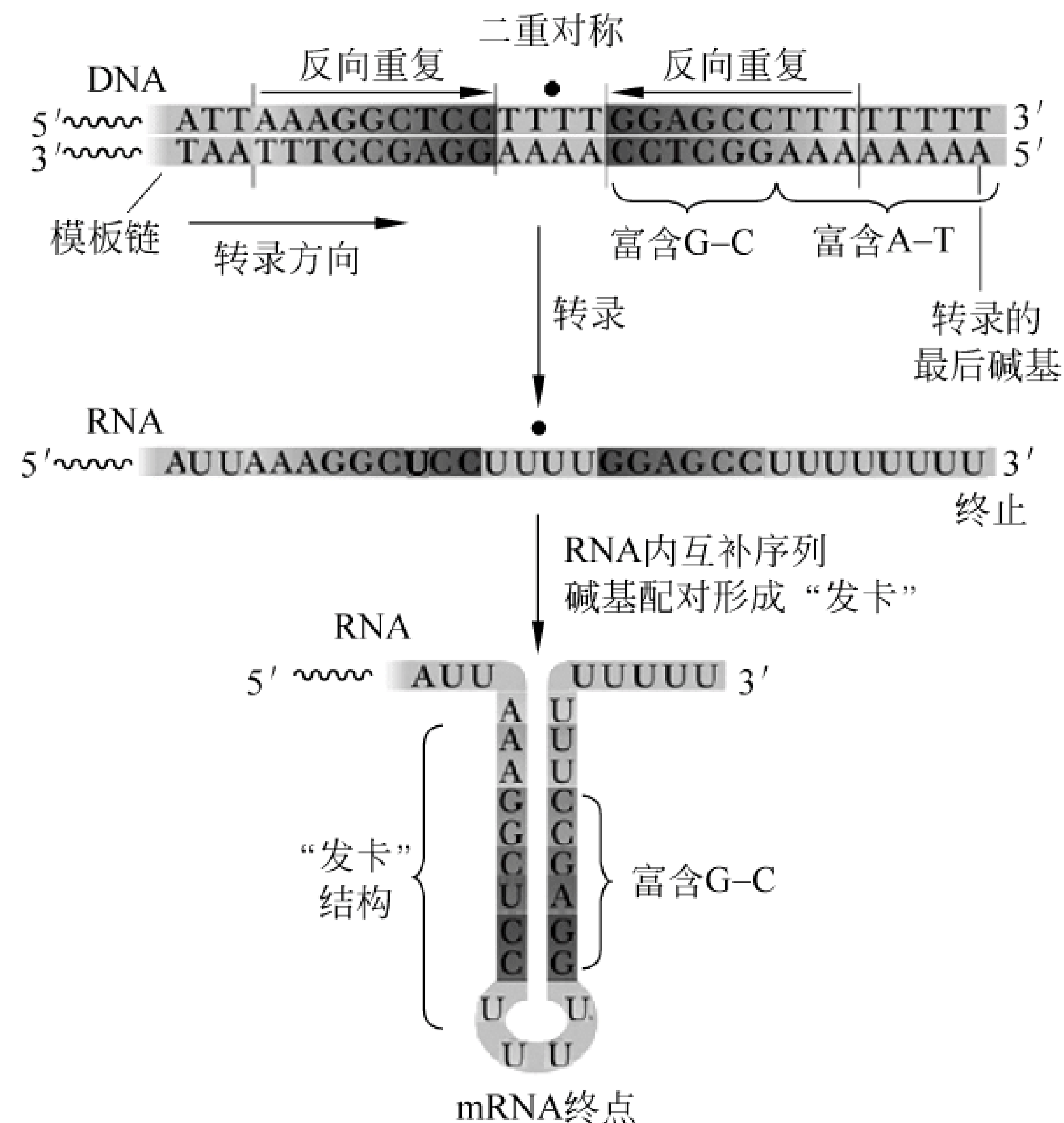


图 10.9 内在终止

编码 Trp 生物合成酶的 *E. coli trp* 操纵子终止部位。转录出反向重复形成茎-环，或称“发卡”结构，转录终止在一系列 U 残基处

2. ρ 因子依赖性终止

在 ρ 因子依赖性终止中，ρ 因子是个六聚体的 ATP 依赖性 RNA-DNA 解旋酶。首先 ρ 因子识别 RNA 转录物中富含 C 的识别位点并与该位点结合，跟在 RNA 聚合酶后移动。当 RNA 聚合酶停止在转录终止位点时，ρ 因子使 RNA-DNA 杂合体解旋，释放出新合成的 RNA 转录物（图 10.10）。

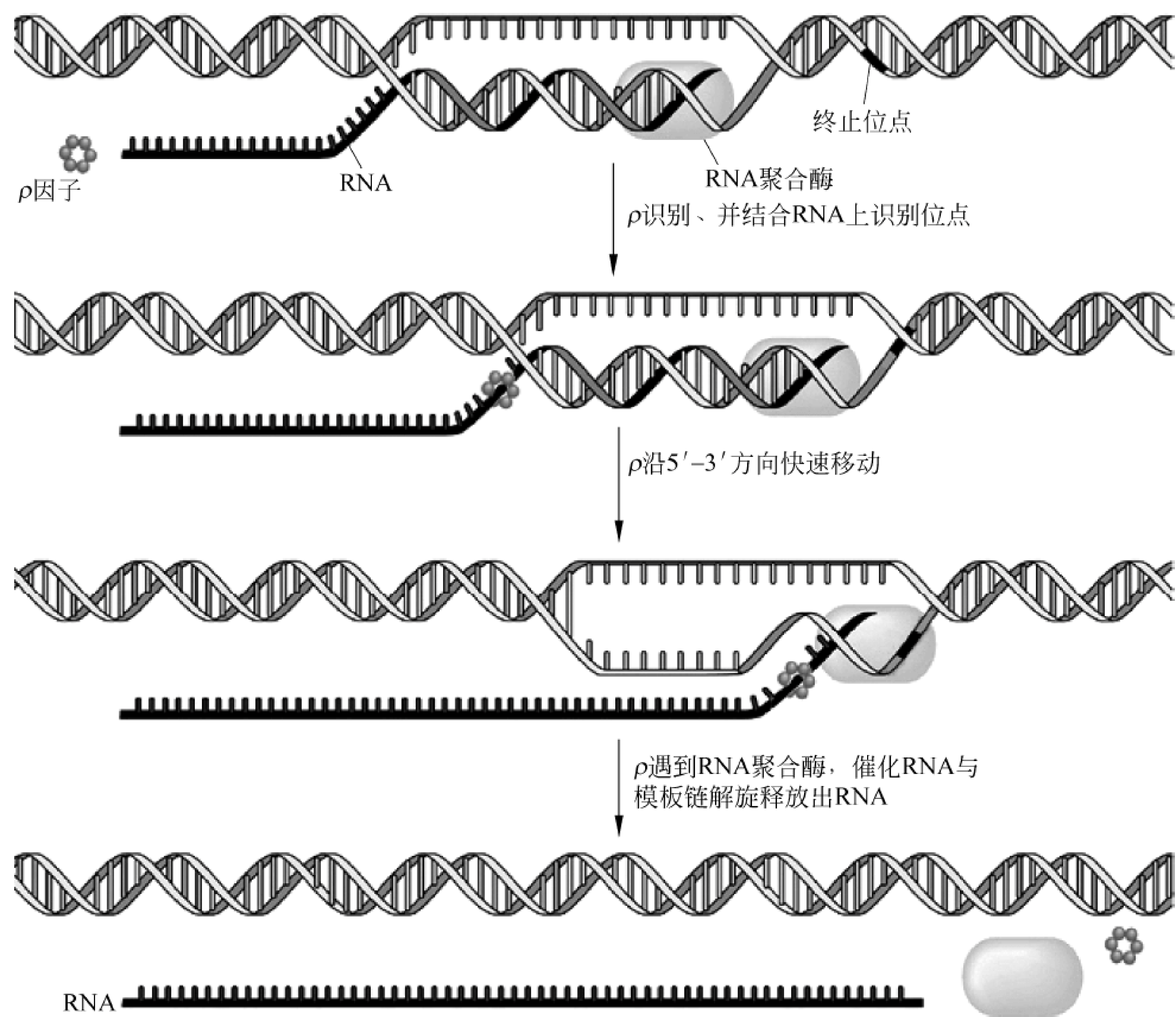


图 10.10　ρ 因子依赖性终止

10.4　真核生物中的转录

原核生物中的转录只是由单一一个 RNA 聚合酶执行的，但在真核生物中，却是由几种类似的 RNA 聚合酶完成的，而且还需要更多的辅助蛋白。

10.4.1　RNA 聚合酶和转录因子

真核生物细胞核含有转录不同 RNA 种类的 3 种 RNA 聚合酶：

(1) RNA 聚合酶Ⅰ(RNA pol Ⅰ)位于核仁，转录大多数 rRNA 的前体。

(2) RNA 聚合酶Ⅱ(RNA pol Ⅱ)位于核质，转录编码蛋白质的基因，负责转录 mRNA 的前体。

(3) RNA 聚合酶Ⅲ(RNA pol Ⅲ)位于核质，转录 tRNA、5S rRNA 和各种其他小的核 RNA 以及胞质 RNA 的前体。

除了这些核内酶之外，真核细胞还含有线粒体和叶绿体(植物)RNA pol。

所有 3 类 RNA pol 都需要通过辅助蛋白转录因子(transcription factors，TFs)与相应的启动子作用起始转录，而转录因子是一类通过与基因或基因附近序列结合，或通过与其他

结合基因的蛋白质的相互作用促进基因转录的蛋白质。表 10.2 给出了来自人细胞中的一些通用转录因子的特征和功能。

表 10.2　通用转录因子

转录因子	亚基数	功　　能
TFⅡD		
TBP	1	专一识别 TATA 框；募集 TFⅡB
TAFs	14	识别非 TATA 元件，具有正和负调节功能，组蛋白乙酰转移酶活性
TFⅡA	3	稳定 TBP 结合，稳定 TAF-DNA 相互作用
TFⅡB	1	募集 RNA pol Ⅱ-TFⅡF，用于 RNA pol Ⅱ的起始位点选择
TFⅡF	2	RNA 聚合酶Ⅱ定位于启动子，阻止 RNA pol Ⅱ与 DNA 序列非特异性相互作用
TFⅡE	2	募集 TFⅡH，TFⅡH 解旋酶的调控，ATP 酶活性，激酶活性
TFⅡH	11	解旋酶活性，通过使 CTD 磷酸化使 RNA pol Ⅱ脱离启动子

10.4.2　转录

以 RNA pol Ⅱ负责编码 mRNA 的基因转录为例，描述真核生物的转录。所有真核生物 mRNA 前体都是由 RNA pol Ⅱ转录的。RNA pol Ⅱ由 12 个不同的亚基组成，从酵母到人都是非常保守的。转录开始于前起始复合物(preinitiation complex)的形成，这个复合物包含 RNA 聚合酶Ⅱ和 6 个通用转录因子(general transcription factors，GTFs)：TFⅡA、TFⅡB、TFⅡD、TFⅡE、TFⅡF 和 TFⅡH。

真核生物的转录类似于原核生物，也是从启动子开始。原核生物中一个启动子有时可以指导几个基因的转录，但真核生物中一个启动子只负责一个基因的转录。图 10.11 给出了几种真核生物结构基因的启动子序列。在位于转录起点位点(＋1)的上游－25～－30 核苷酸处有一段类似于原核生物启动子(TATAAT)－10 区的富含 AT 的 TATA 框，因基因不同它的位置和各位置核苷酸有些变化。TATA 框是转录因子识别以及与 RNA 聚合酶Ⅱ一起组装成前起始复合物的位点。围绕转录起始位点＋1 左右的序列称为起始子(initiator，Inr)，DNA 在起始子处解旋。

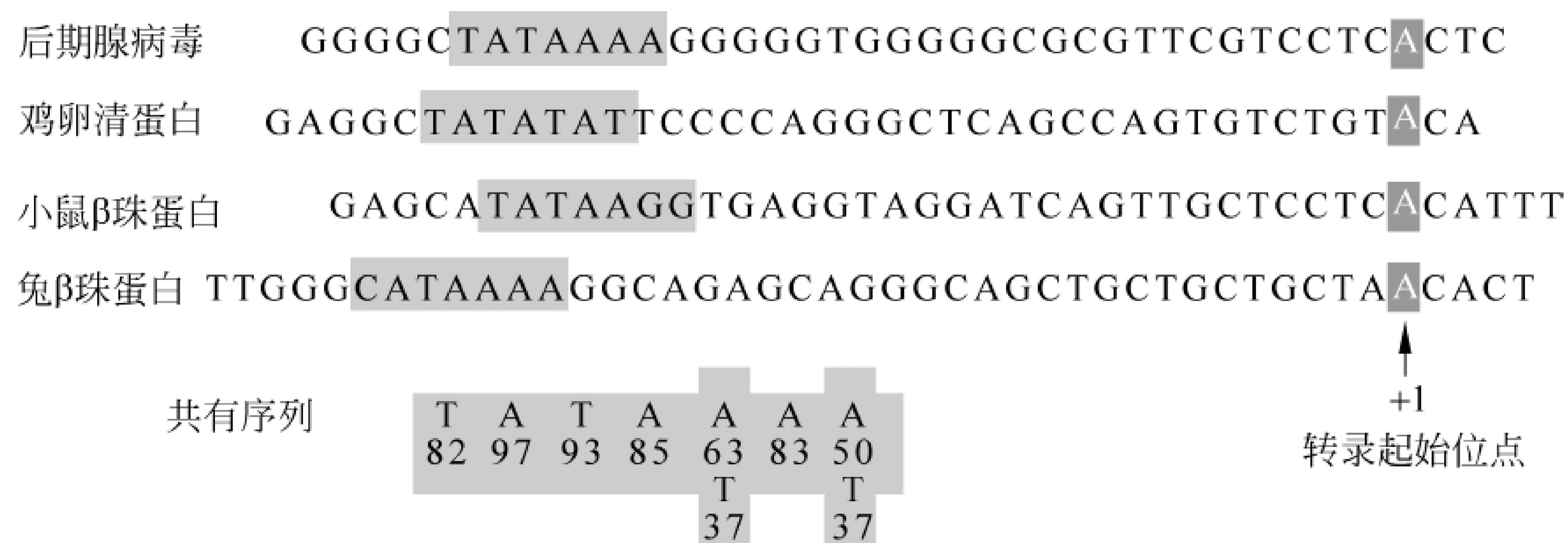


图 10.11　几种真核生物结构基因的启动子序列

图下面一行序列表示一些启动子的共有序列，序列下面数字表示不同碱基在给出位置出现的百分率

转录必须要先组装前起始复合物,组装的第一步是 TFⅡD 中一个亚基 TATA 结合蛋白(TATA-binding protein,TBP)识别并结合 TATA 框,启动前起始复合物的形成。然后是 TFⅡA、TFⅡB 和 TFⅡF-RNA pol Ⅱ依次结合,最后 TFⅡE 和 TFⅡH 结合形成封闭的前起始复合物(DNA 双链未解旋)(图 10.12)。TFⅡF-RNA pol Ⅱ中的 TFⅡF 通过与 TFⅡB 相互作用,降低了 RNA pol Ⅱ与 DNA 上非专一结合位点的结合,将 RNA pol Ⅱ定位在启动子上。

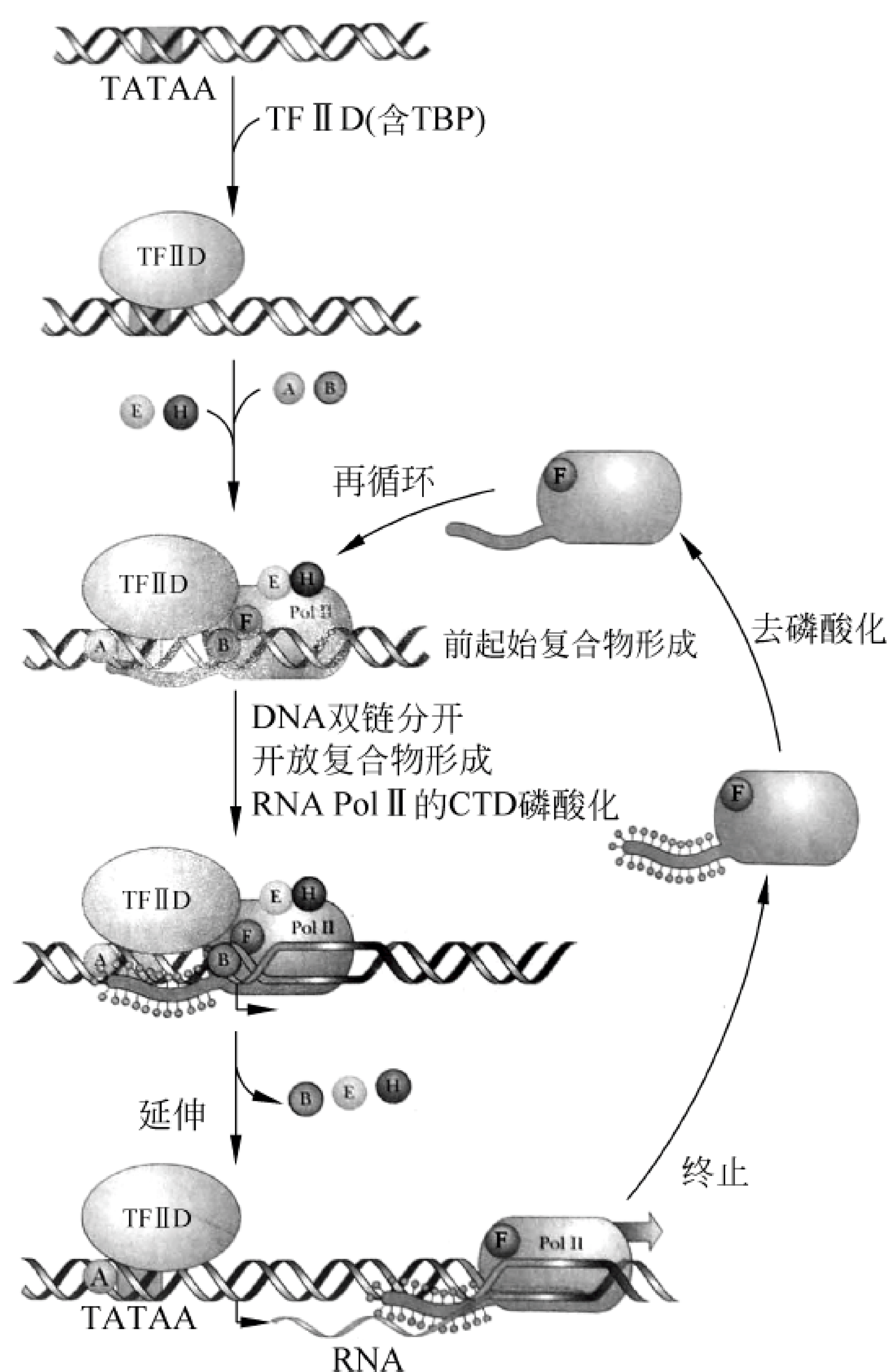


图 10.12　起始复合物的组装和转录

图中字母都代表相应的转录因子,例如 A 代表 TFⅡA

一旦前起始复合物形成,依赖 ATP 的 TFⅡH 的解旋酶活性促进转录起始位点处 DNA 解旋,封闭的前起始复合物转变为开放复合物。然后 TFⅡH 的激酶活性催化 RNA pol Ⅱ的一个大亚基 C 末端结构域(C-terminal domain,CTD)磷酸化,导致 DNA 双链分开的开放复合物形成,启动转录,TFⅡF-RNA pol Ⅱ离开启动子进行转录延伸。

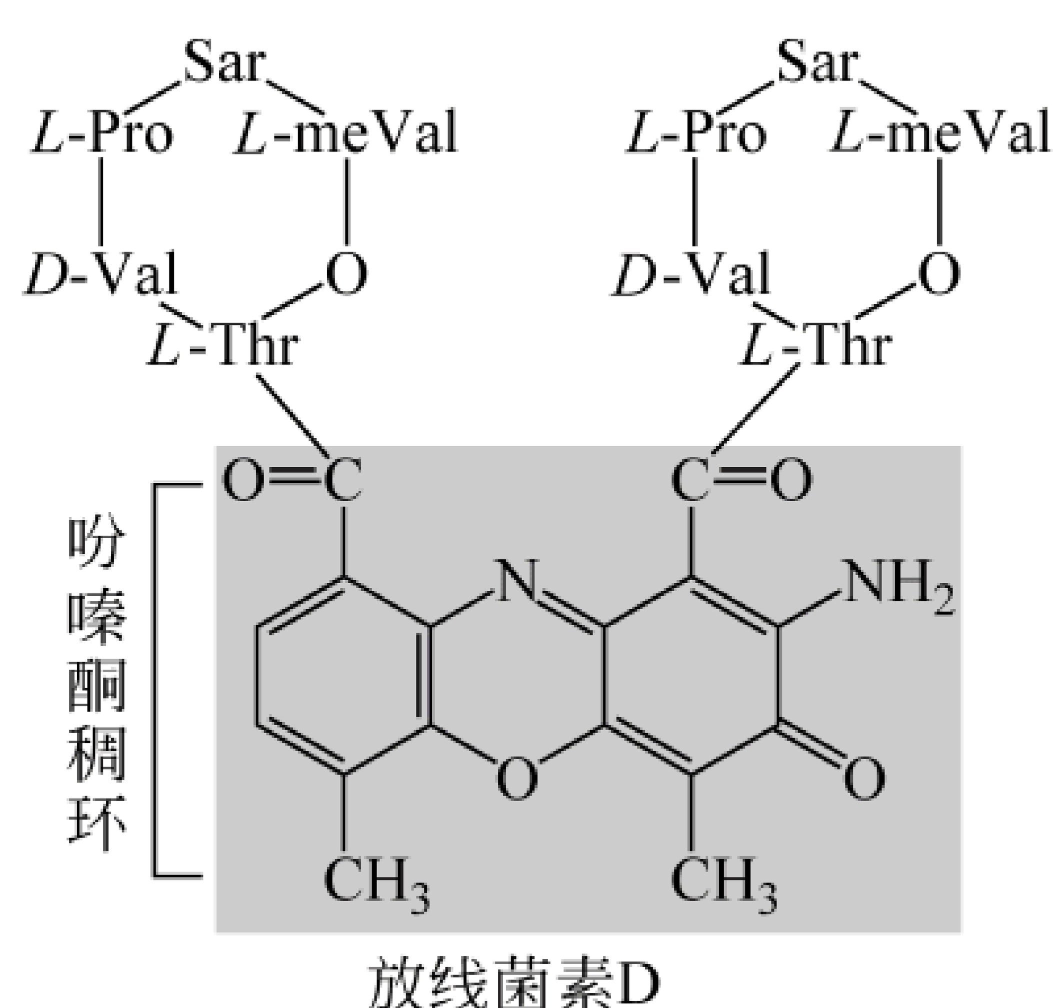
转录终止可能是从停止 RNA pol Ⅱ沿着模板链移动开始。在真核生物中存在着一个用于终止的共有序列 AAUAAA,该序列可能处于远离 mRNA 实际末端的 100-1000 碱基中。转录终止后转录物被释放,磷酸化的 RNA pol Ⅱ开放复合物脱离 DNA,经磷酸酶催化去磷酸,RNA pol Ⅱ和 TFⅡF 的复合物被再循环用于另一轮转录。

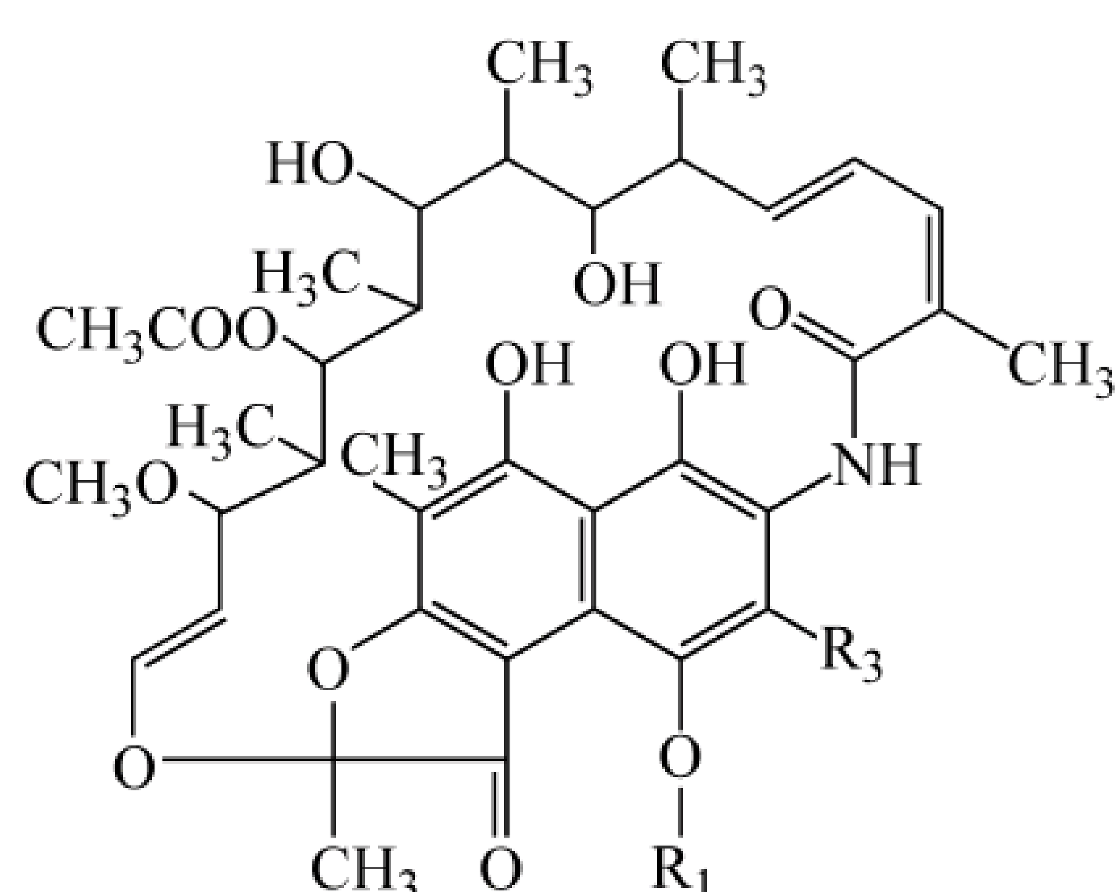
10.5 转录抑制剂

许多化合物都能够抑制原核生物和真核生物的转录，这类化合物统称为转录抑制剂，其中有的抑制剂抑制转录起始，有的抑制转录延伸。

1. 放线菌素 D

放线菌素 D(actinomycin D)来自链霉菌，带有一个吩噁嗪酮稠环(phenoxazone)和两个五环肽[*L*-甲基缬氨酸(*L*-meVal)、肌氨酸(sareosine)、*L*-Pro、*D*-Val 和 *L*-Thr](图 10.13)。放线菌素 D 中的吩噁嗪酮稠环平面可以插入到相邻的 G-C 碱基对之间，使双螺旋变形，结构中的两个五环肽占据 DNA 双螺旋空间，阻塞转录的延伸。在很低的浓度下放线菌素 D 都能有效地抑制原核生物和真核生物转录的延伸过程。





利福霉素B　$R_1=CH_2COO^-$; $R_2=H$

利福平　$R_1=H$; $R_2=CH=\overset{+}{N}$(哌嗪环)$N—CH_3$

图 10.13　放线菌素 D、利福霉素和利福平

其中放线菌素 D 分子中的 Sar 为肌氨酸，*L*-meVal 为 *L*-甲基缬氨酸

由于放线菌素 D 能与 DNA 双螺旋紧密结合有效地抑制转录，所以放线菌素 D 是个非常有用的抗肿瘤剂。

2. 利福霉素

利福霉素(rifamycin)是另一个非常有用的抗生素，也是从链霉菌分离出来的。利福霉素通过直接与细菌中的 RNA 聚合酶的 β 亚基结合来抑制 RNA 合成，特异地抑制第一个磷酸二酯键的形成，即抑制转录的起始。一旦 RNA 链起始反应后，利福霉素就不能影响 RNA 链的延伸了。由于利福霉素不抑制真核生物的 RNA 聚合酶，所以合成的利福霉素衍生物利福平(rifampicin)已用作为临床的抗结核菌药。

3. 鹅膏蕈碱

α-鹅膏蕈碱(amanitin)结构为一稀有的双环八肽，是由鬼笔鹅蕈(*Amanita phalloides*)(一种毒蘑菇)生产的鹅膏毒素之一(图 10.14)。α-鹅膏蕈碱与 RNA pol Ⅱ形成紧密的 1∶1 复合物，特异阻断转录的延伸反应。然而 α-鹅膏蕈碱对 RNA pol Ⅲ的抑制作用较小，对 RNA pol Ⅰ以及线粒体、叶绿体和原核生物的 RNA 聚合酶都没有抑制作用。

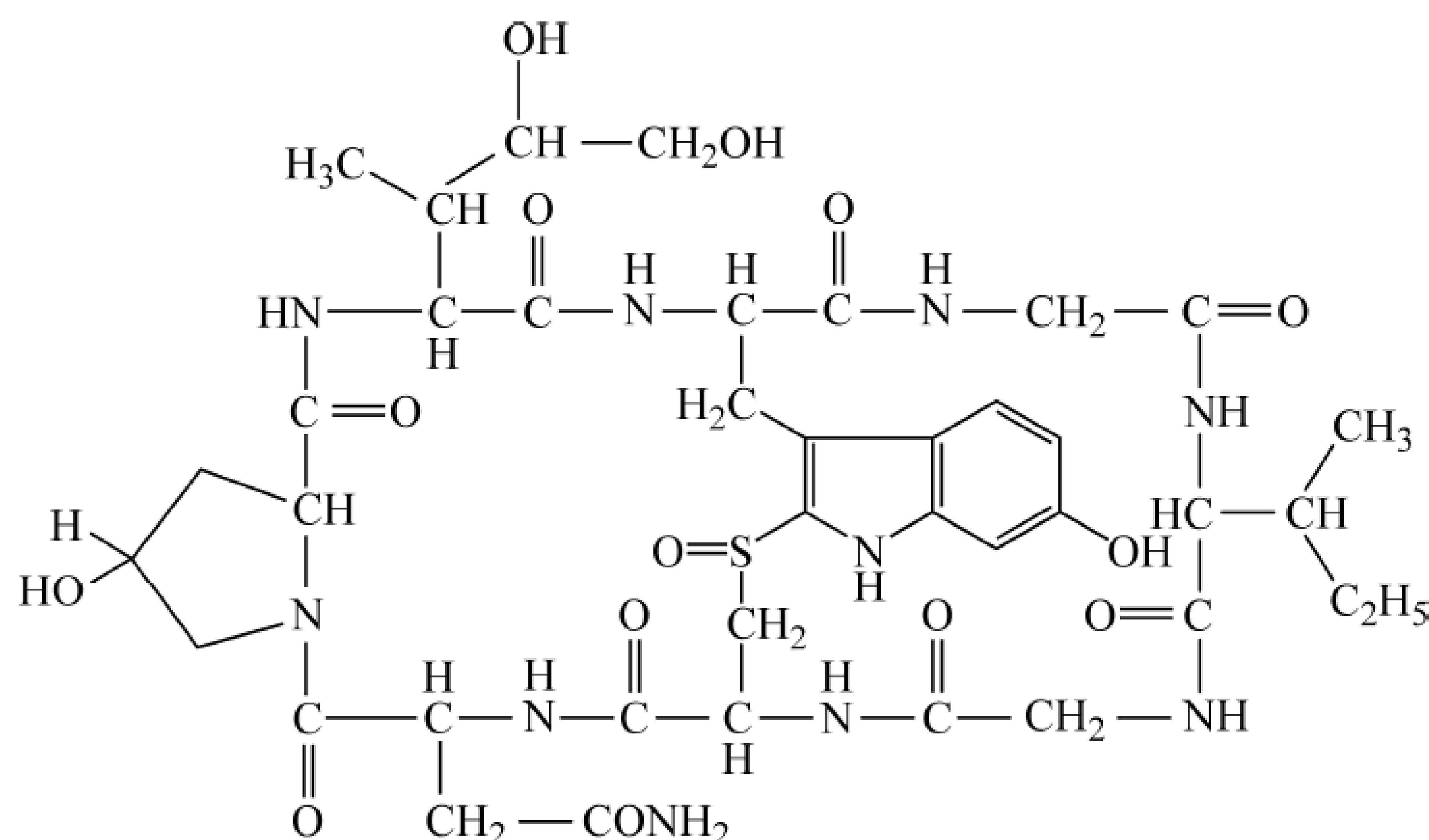


图 10.14　α-鹅膏蕈碱结构

鹅膏毒素毒性很强，约40g鲜毒蘑(含5～6mg毒素)足以使一个成人丧命，但鹅膏毒素作用缓慢，通过破坏肝功能使人在中毒数天后死亡。

10.6　转录调控

一些原核生物基因的转录调控研究得比较透彻，首先以 *E. coli* 乳糖操纵子(*lac* operon，*lac* 操纵子)和 *trp* 操纵子为例，描述调控基因转录的阻遏作用和分解代谢物阻遏作用，然后介绍发生在 *trp* 操纵子中的转录弱化作用。

10.6.1　*lac* 操纵子

图 10.15 给出的 *lac* 操纵子由两个转录单元组成，其中一个单元由分别编码 β-半乳糖苷酶、通透酶、转乙酰酶的 *Z*、*Y* 和 *A* 结构基因以及调控它们转录的 *P*(启动子)和 *O*(操纵基因)组成。另一个转录单元由上游的 *I*(调控基因)和它自己的 P_I(启动子)构成。*I* 编码可形成四聚体(实际上是两个二聚体聚合形成的)阻遏蛋白(也称为阻遏物)的多肽，阻遏蛋白与操纵基因结合，可阻止结构基因的转录。

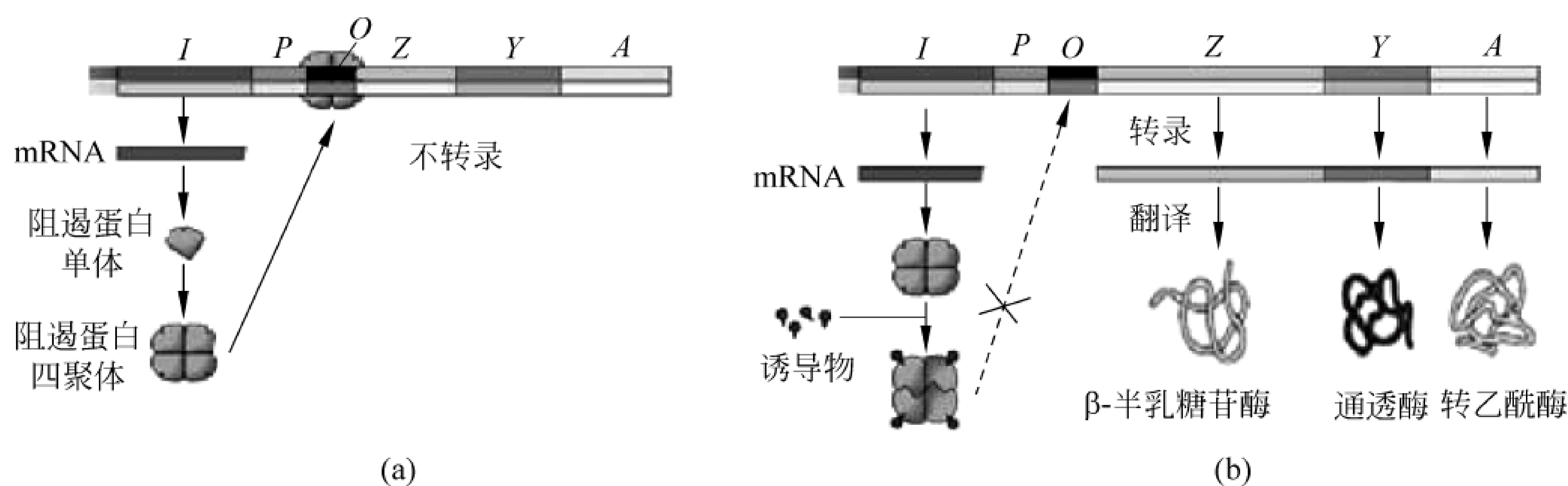


图 10.15　*lac* 阻遏蛋白的作用模式

(a) 在没有诱导物时，阻遏蛋白与操纵子的操纵基因结合，阻止转录；(b) 当存在诱导物时，由于阻遏蛋白与诱导物结合后不能再与操纵基因结合，结构基因得以转录和翻译

像阻遏蛋白那样通过与操纵基因结合使转录系统关闭的作用称为负调节(negative regulation),而阻遏蛋白也称为负调节物。但是当有合适的可与阻遏蛋白结合的诱导物(inducer)存在时,由于诱导物与阻遏蛋白结合改变了阻遏蛋白的构象,使得阻遏蛋白不能再与操纵基因结合,RNA 聚合酶结合在启动子上转录结构基因。

诱导物可以是乳糖的代谢物 1,6-别乳糖以及人工合成的异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside,IPTG)(图 10.16)。1,6-别乳糖是乳糖经 β-半乳糖苷酶催化偶尔转糖基作用生成的,也可以说乳糖是 *lac* 操纵子转录的诱导物。1,6-别乳糖可经 β-半乳糖苷酶催化快速转换为葡萄糖和半乳糖。β-半乳糖苷酶通常直接催化乳糖生成葡萄糖和半乳糖,但 β-半乳糖苷酶不能水解 IPTG。实验室中常用 IPTG 诱导含有 *lac* 启动子的质粒载体在细菌中的重组蛋白的表达。

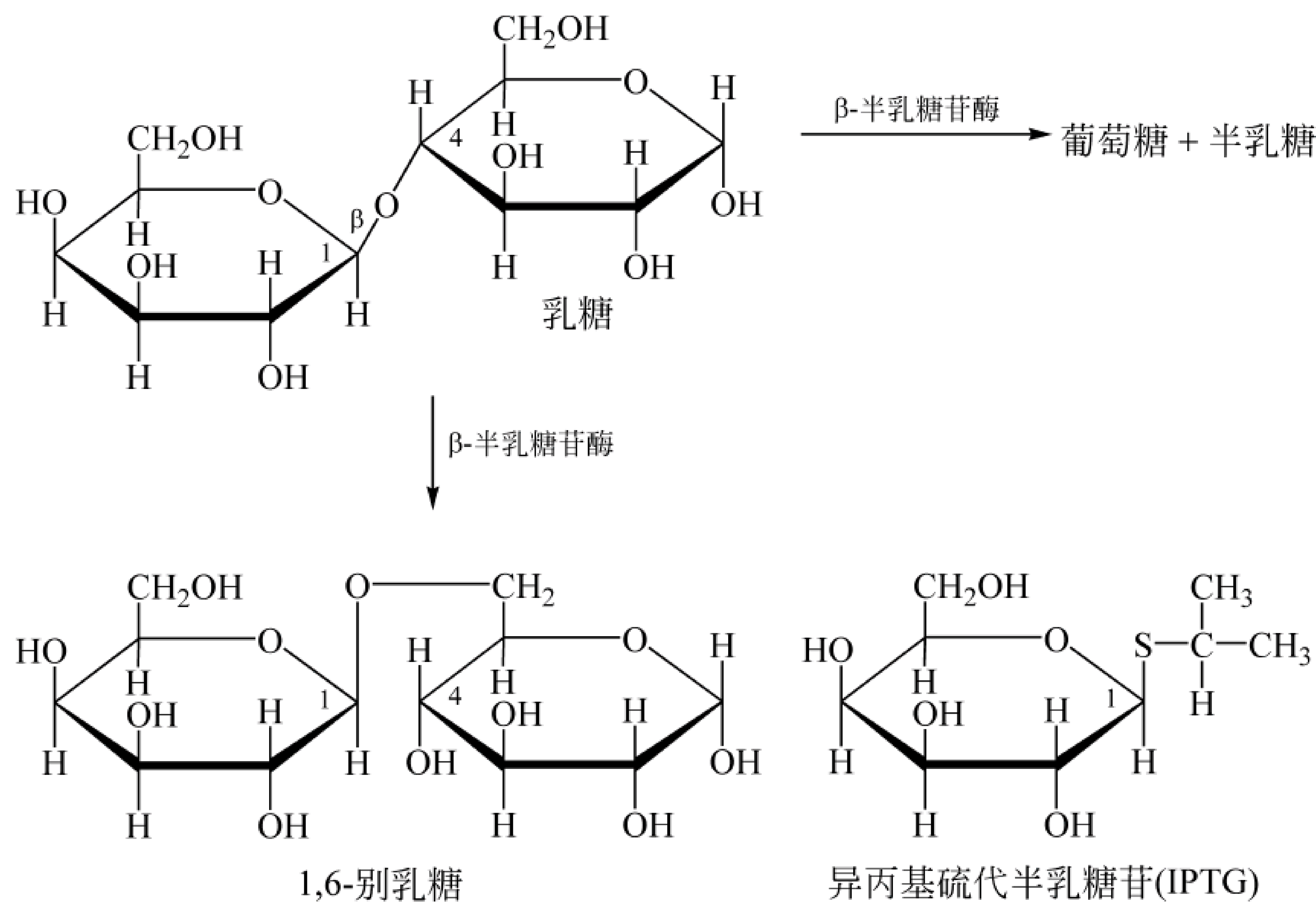


图 10.16　1,6-别乳糖和异丙基硫代半乳糖苷结构

阻遏蛋白与 *lac* 操纵子的操纵基因结合关闭转录,乳糖代谢物 1,6-别乳糖等与阻遏蛋白结合阻止阻遏蛋白与操纵基因结合,因而启动转录,阻遏蛋白、诱导物和操纵基因这种相互作用给出了一个直观的转录开/关模型。

除了乳糖以外还存在其他影响乳糖代谢酶系表达的因素,例如当培养基中同时含有葡萄糖和乳糖时,由于细菌生长优先利用葡萄糖,*lac* 操纵子的表达就会被葡萄糖抑制,这种抑制现象称为分解代谢物阻遏(catabolite repression)。这种抑制作用是一种随着细胞的生理状态变化而使基因同步表达的作用,即只要存在可利用的葡萄糖,*E. coli* 就优先代谢葡萄糖。分解代谢物阻遏可确保在葡萄糖耗尽之前那些可替代能源,例如乳糖代谢所必需的 *lac* 操纵子维持在被抑制的状态。分解代谢物阻遏可消除可能存在的任何诱导物的影响,防止乳糖等能源酶系统的浪费。

分解代谢物阻遏作用涉及启动子,启动子上存在两个结合位点,一个结合 RNA 聚合酶,另一个结合分解代谢物激活蛋白(catabolite activator protein,CAP)。CAP 与启动子的结合取决于是否存在 cAMP,cAMP 的结合会增强 CAP 对启动子的亲和性,所以 CAP 也称

为 cAMP 受体蛋白(cAMP receptor protein,CRP)。

当细胞缺乏葡萄糖时导致腺苷环化酶激活,细胞的 cAMP 水平提高。CAP 与 cAMP 形成 CAP-cAMP 复合物并结合到启动子的 CAP 位点,结果使得 RNA 聚合酶能够结合到启动子上,启动 *lac* 操纵子转录。由于 CAP 增强转录,所以通过 CAP 的转录调控类型也称为正调节(positive regulation)(图 10.17)。

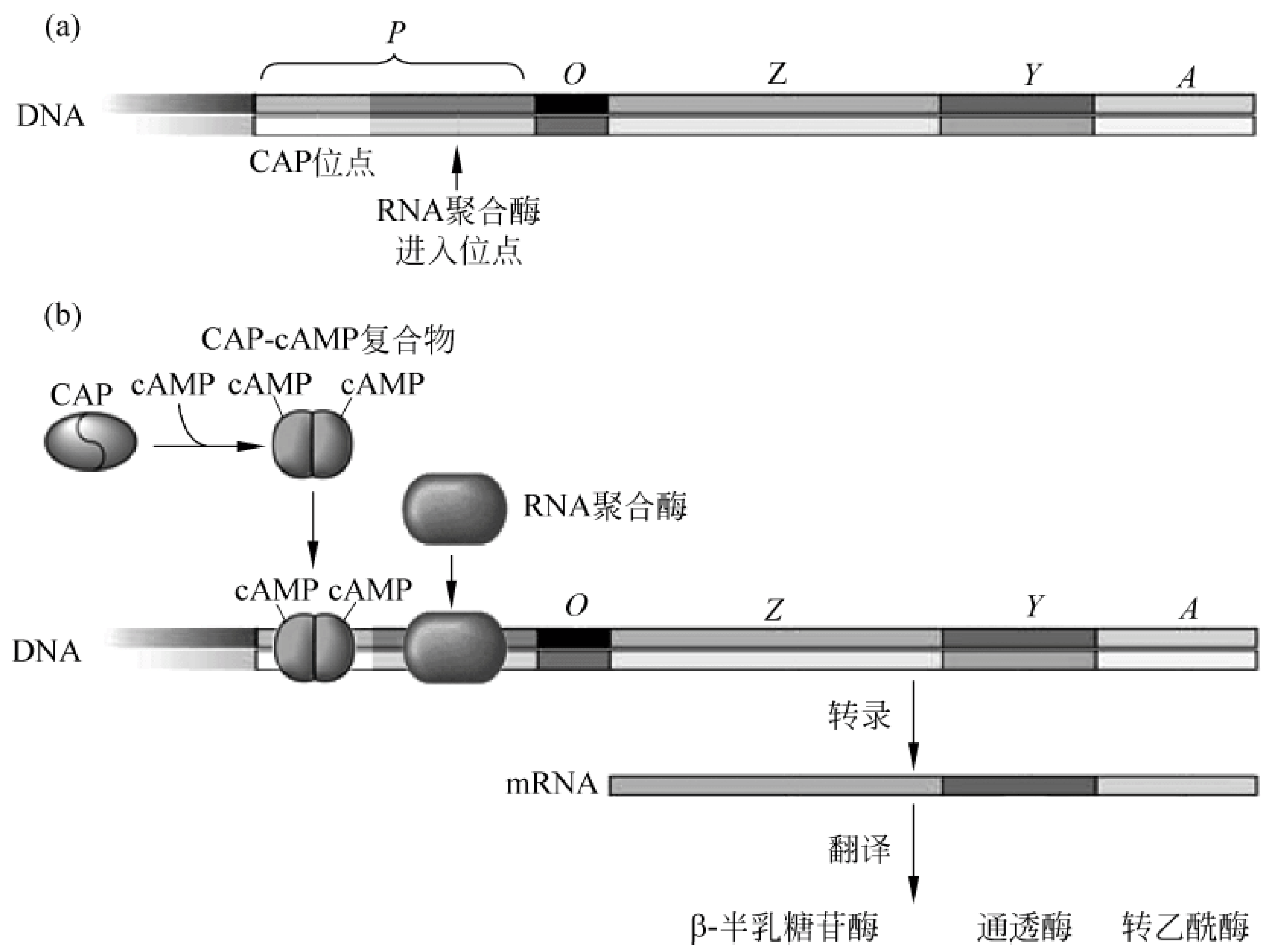


图 10.17　分解代谢物阻遏作用

(a) *lac* 操纵子的调控位点,CAP-cAMP 复合物结合 CAP 位点;(b) 当缺少葡萄糖时,CAP 与 cAMP 形成 CAP-cAMP 复合物,然后与 CAP 位点结合,使得 RNA 聚合酶结合到启动子上,启动转录

10.6.2　*trp* 操纵子与转录弱化作用

trp 操纵子(tryptophan operon)由一个启动子、一个操纵基因和一个编码 5 个多肽的结构基因组成,其中 *trpE* 和 *trpD* 分别编码邻氨基苯甲酸合成酶的 ε 和 δ 链;*trpC* 编码吲哚甘油磷酸合成酶;*trpB* 和 *trpA* 分别编码 Trp 合成酶的 β 链和 α 链,这 3 个酶催化由分支酸合成色氨酸的反应(图 10.18)。

与 *lac* 操纵子不同,Trp 阻遏蛋白不能直接结合操纵基因,而是受色氨酸调控。当 Trp 丰富时,Trp 阻遏蛋白结合两分子 Trp 被活化后与操纵基因结合,阻止 RNA 聚合酶结合,操纵子不能被转录。当 Trp 处于低水平时,缺少 Trp 的 Trp 阻遏蛋白不能结合操纵基因,阻遏作用消除,RNA 聚合酶启动转录。

除了 Trp 阻遏蛋白的阻遏作用之外,Charles Yanofsky 等发现 *trp* 操纵子的 *trpO* 与 *trpE* 之间一段序列缺失突变可以使 *trp* 操纵子的表达提高 6 倍,而且这种现象与阻遏作用无关,因为无论是阻遏还是去阻遏,转录水平都增强了,表明还存在着第二种调控机制。Charles Yanofsky 等人提出了称为转录弱化作用(transcription attenuation)的调控机制,这种弱化作用会在 Trp 水平高时使 *trp* 操纵子转录提前终止。

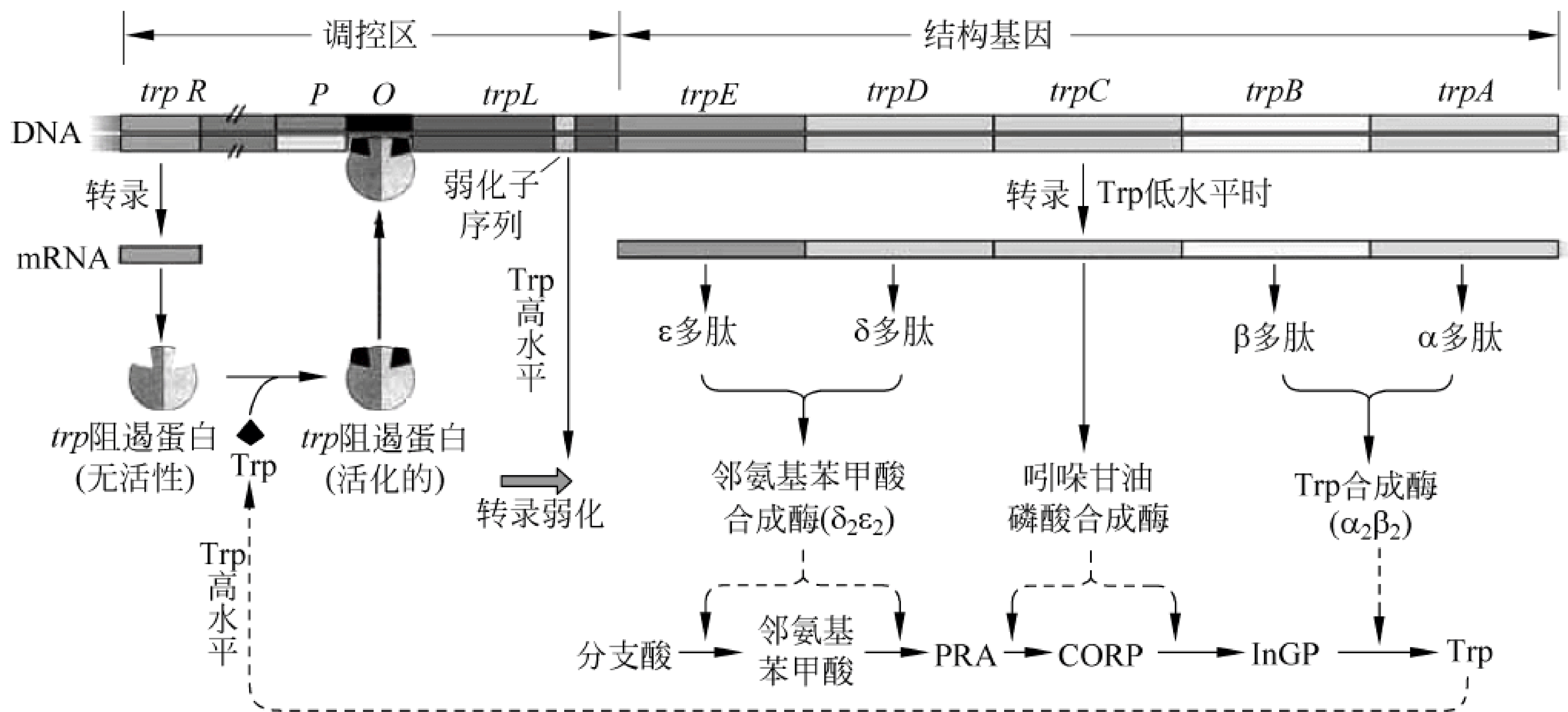


图 10.18　*trp* 操纵子

PRA：N-5′-磷酸核糖邻苯氨基甲酸；CORP：N-5′-磷酸-1′-脱氧核酮糖邻氨基苯甲酸；InGP：吲哚甘油磷酸酯

转录弱化作用利用的是 *trp* 操纵子前导序列(leader sequence,*trpL*)中的弱化子序列(编码两个连续 Trp 的 6 个核苷酸序列)。由 162 个核苷酸组成的 *trpL* 转录产物 mRNA 中包含 1、2、3 和 4 序列在内的 4 个特殊序列。序列 1 含有可被翻译成带有连续两个 Trp 的 14 个残基的多肽(称为前导肽)的序列,而且序列 1 与 2 之间,3 与 4 之间及 3 与 2 之间都有通过碱基配对形成发卡结构的可能性(图 10.19)。但究竟 3 与 4 还是 3 与 2 形成发卡结构取决于色氨酸水平高低,由序列 1 决定。

由于原核生物的转录与翻译是偶联在一起的,所以在 *trpL* 转录起始后,核糖体就结合到 mRNA 上进行前导肽翻译。当 Trp 水平高时,负载 Trp 的 Trp-tRNA^{Trp}(提供肽链合成的色氨酸,下一章讲到)水平也很高时,翻译可快速通过两个 Trp 密码子,进入序列 2,由于序列 2 被核糖体覆盖,当转录出序列 3 后,序列 3 不能与序列 2 配对,导致末端带有 8 个连续 U 的 3-4 终止子结构的形成,结果还未进行结构基因(*trpE*～*trpA*)转录,转录就被提前终止,这就是一种转录弱化作用(图 10.20)。

当 Trp 水平低时,Trp-tRNA^{Trp}浓度也低,核糖体就停留在序列 1 中连续的两个 Trp 密码子处。当序列 3 合成后就与处于没有配对的序列 2 配对,形成了一个抗终止子,后合成的序列 4 就不会再与 3 形成终止子了,使得核糖体通过序列 4,继续转录,直至完成 *trp* 操纵子结构基因的转录。总之弱化子可以根据 Trp 供应情况调控 *trp* 操纵子的转录。

10.6.3　真核生物中的转录调控

在真核生物转录一节中看到由 RNA 聚合酶和通用转录因子组成的转录机器其功能是起始转录,这对于所有 mRNA 的转录都是一致的。但是单独这样的一个转录机器只是进行低水平的基础转录(basal level),而一些基因的实际转录水平要比基础水平高许多倍,这么大的差异是由于称为激活剂(activators)的基因特异性转录因子作用的结果。核酸一章已描述过真核生物的染色质中 DNA 是与组蛋白组装在一起的,DNA 紧密地缠绕在组蛋白周围。虽然许多启动子和其他调控 DNA 序列多数时间不能接近,但借助于一些转录因子仍然可使两者相互作用。

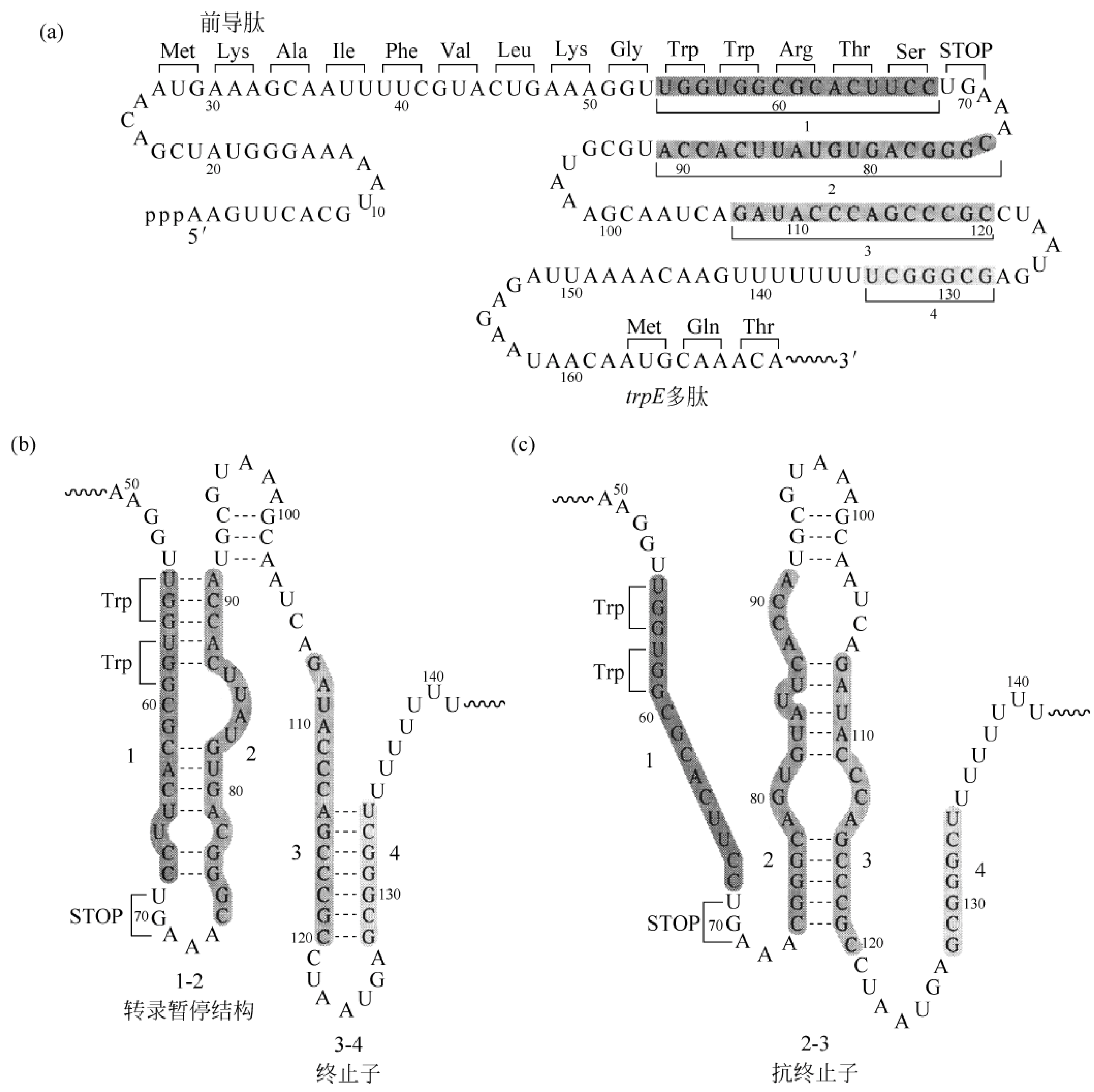


图 10.19 *trpL* 前导序列

(a) *trpL* 前导序列的 mRNA,含有两个连续 Trp 密码子(UGG UGG)以及末端连有终止翻译的终止密码子 UGA;(b) 序列 1 和 2 互补形成转录暂停结构,序列 3 与 4 碱基配对形成一个 3-4 终止子结构;(c) 序列 2 与 3 互补,形成一个 2-3 抗终止子结构

1. 增强子和沉默子

增强子(enhance element)和沉默子(silencer)分别为增强和削弱转录的调控序列,这些序列可位于转录起始子的上游或下游。它们都是借助于基因特异性转录因子起作用的。图 10.21 给出了上游增强子元件通过它的相关转录因子增强转录的典型例子。首先转录因子 TFⅡD 与 RNA pol Ⅱ分别与 TATA 框和启动子结合,并且相互作用形成前起始复合物。特异的转录因子与位于基因上游的增强子结合,增强子序列回转成环使得增强子元件和它的相关转录因子能够接触前起始复合物,通过它们的相互作用激活转录起始。

2. 应答元件

响应一些代谢因素的增强子称为应答元件,例如热激元件(heat-shock element,HSE)、

糖皮质激素应答元件（glucocorticoid-response element，GRE）、金属应答元件（metal-response element，MRE）和 cAMP 应答元件（cyclic-AMP-response element，CRE）。这些应答元件都与在一定细胞条件下产生的转录因子结合，并激活几个相关的基因。

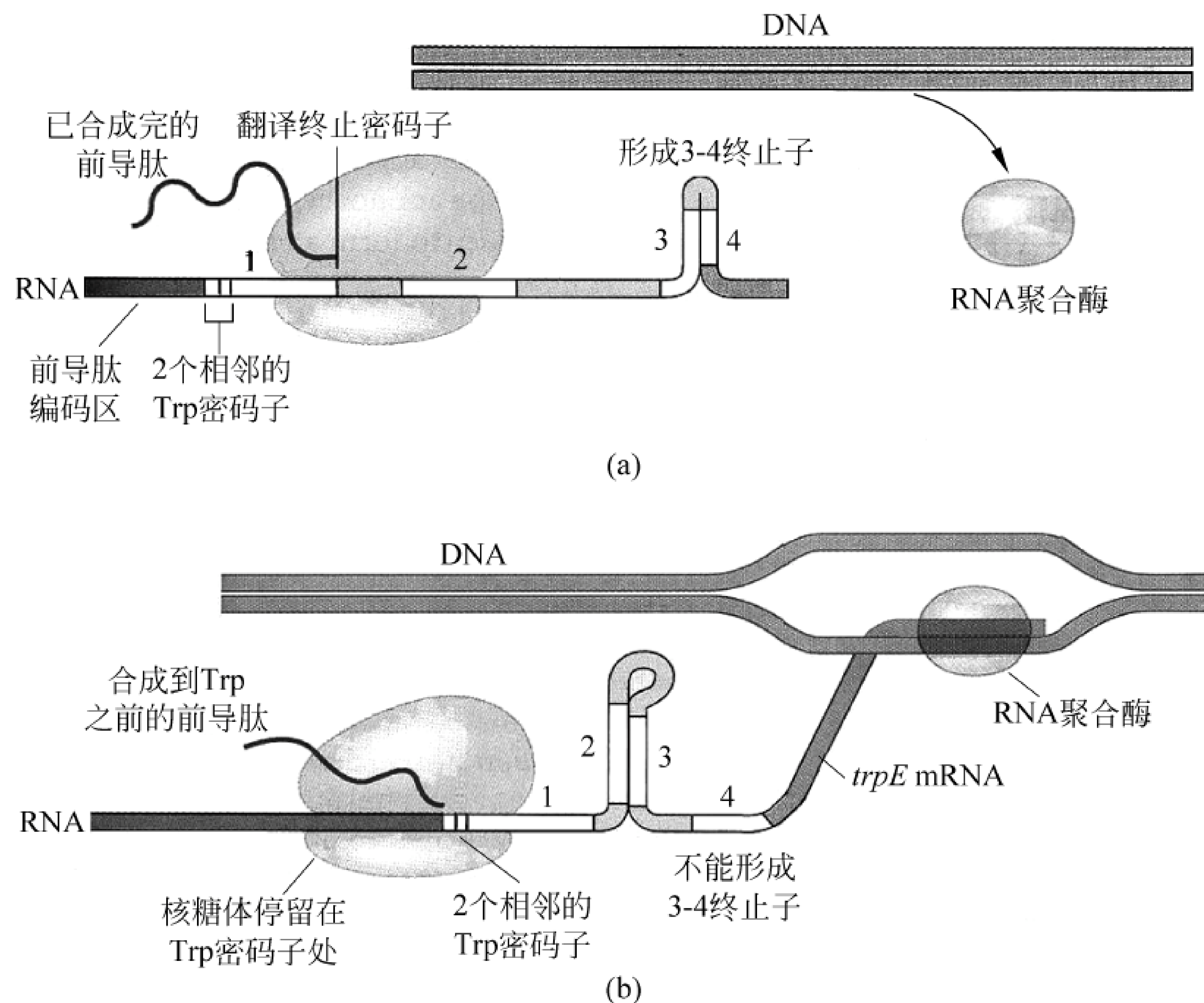


图 10.20　*trp* 操纵子的转录弱化作用机制

（a）Trp 高水平时，Trp-tRNA^{Trp}浓度也高，核糖体通过 Trp 密码子，进入序列 2，序列 3 与随后合成的 4 形成 3-4 终止子，转录终止；（b）当 Trp 低水平时，Trp-tRNA^{Trp}浓度也低，核糖体暂停在序列 1 中的连续两个 Trp 密码子处，使得合成的序列 2 与随后合成的 3 形成了一个 2-3 抗终止子，转录继续

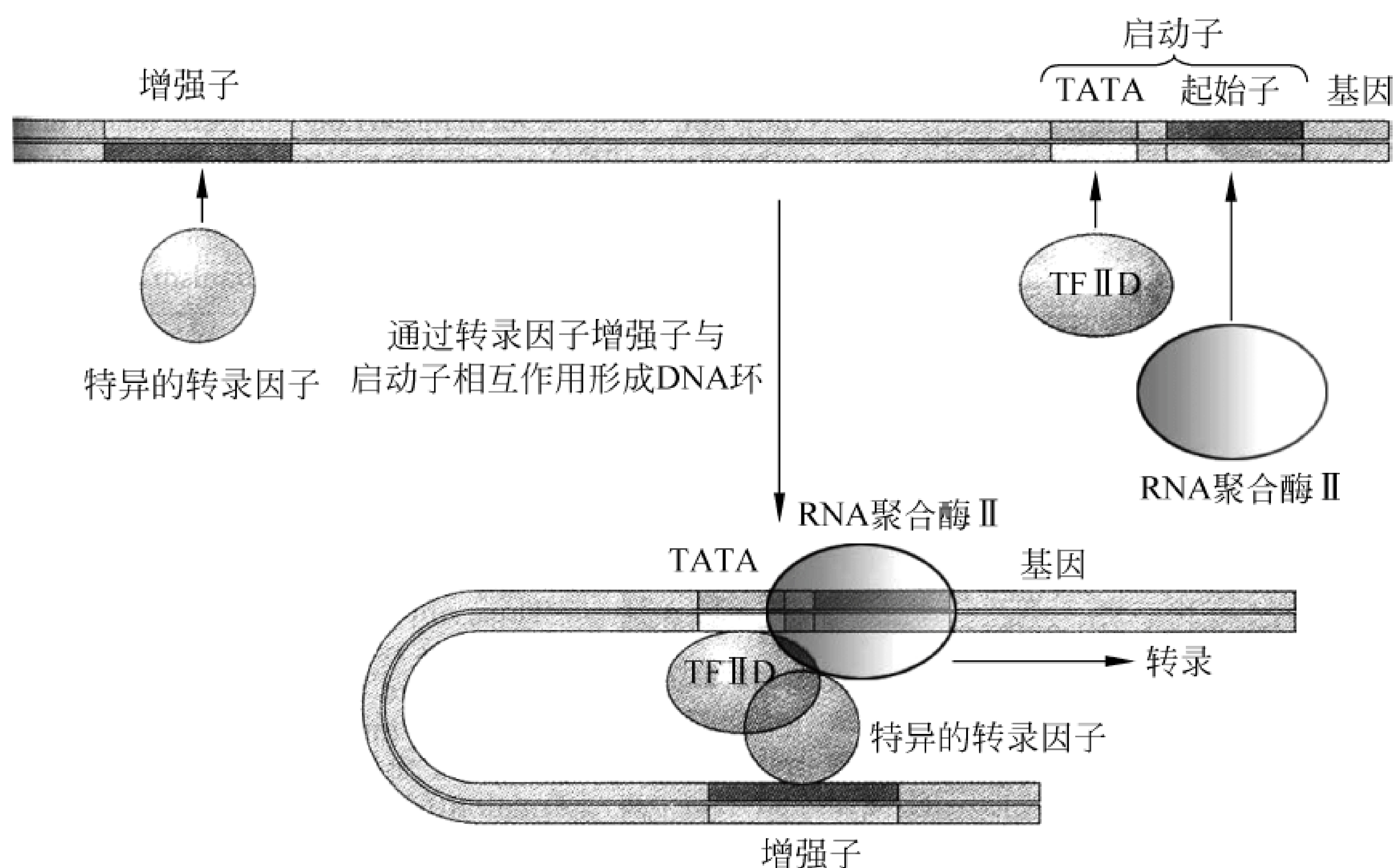


图 10.21　DNA 成环使得增强子与转录因子和 RNA 聚合酶Ⅱ接触

例如,温度升高导致特异的热激转录因子生成,HSE 与之结合使相关基因激活。糖皮质激素经扩散通过脂双层,与胞质溶胶中的糖皮质激素受体结合,受体构象发生变化转变成转录因子,经转运进入细胞核与 DNA 上特定的 GRE 结合激活基因转录。当细胞中 cAMP 水平升高时,使依赖于 cAMP 的蛋白激酶活化,该激酶再将细胞内 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response-element binding protein,CREB)磷酸化,CREB 结合 CRE 并激活相关的基因。表 10.3 给出了 3 种了解得比较清楚的应答元件。

表 10.3　3 种应答元件及其特点

应答元件	生理信号	共有序列	转录因子	分子质量/kDa
HSE	热激	CNNGAANNTCCNNG	HSTF	93
GRE	存在糖皮质激素	TGGTACAAATGTTCT	糖皮质激素受体	94
CRE	cAMP	TGACGTCA	CREB	43

N 代表任意核苷酸

10.6.4　DNA 结合蛋白中的基序结构

在转录过程中与 DNA 结合的一类蛋白质,例如转录因子通过类似于前面蛋白质和酶结构中看到的氢键、静电引力和疏水作用与 DNA 相互作用。激活或抑制 RNA pol Ⅱ转录的大多数 DNA 结合蛋白中都含有两个功能域,一个是 DNA 结合域(DNA-binding domain),也称为 DNA 结合基序(DNA-binding motif),另一个是转录激活域(transcription-activation domain)。DNA 结合域直接作用于 DNA(蛋白∶DNA 相互作用),而转录激活域与其他转录因子作用(蛋白∶蛋白相互作用),间接作用于 DNA,本节将简单描述 DNA 结合域。

DNA 结合域分为螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix,HTH)、锌指(zinc finger)和亮氨酸拉链(leucine zipper)3 种主要类型,这些结合域通常都是与 DNA 双螺旋的大沟作用。

(1) 螺旋-转角-螺旋

螺旋-转角-螺旋基序由两个 α-螺旋和一个 β-转角组成(图 10.22)。羧基端的 α-螺旋是识别螺旋,与 B-型 DNA 的大沟特异结合。识别螺旋的氨基酸残基侧链可以与 DNA 形成疏水键、氢键和发生静电相互作用。另一个 α-螺旋中的氨基酸残基和 DNA 中的磷酸戊糖骨架发生非特异性结合。

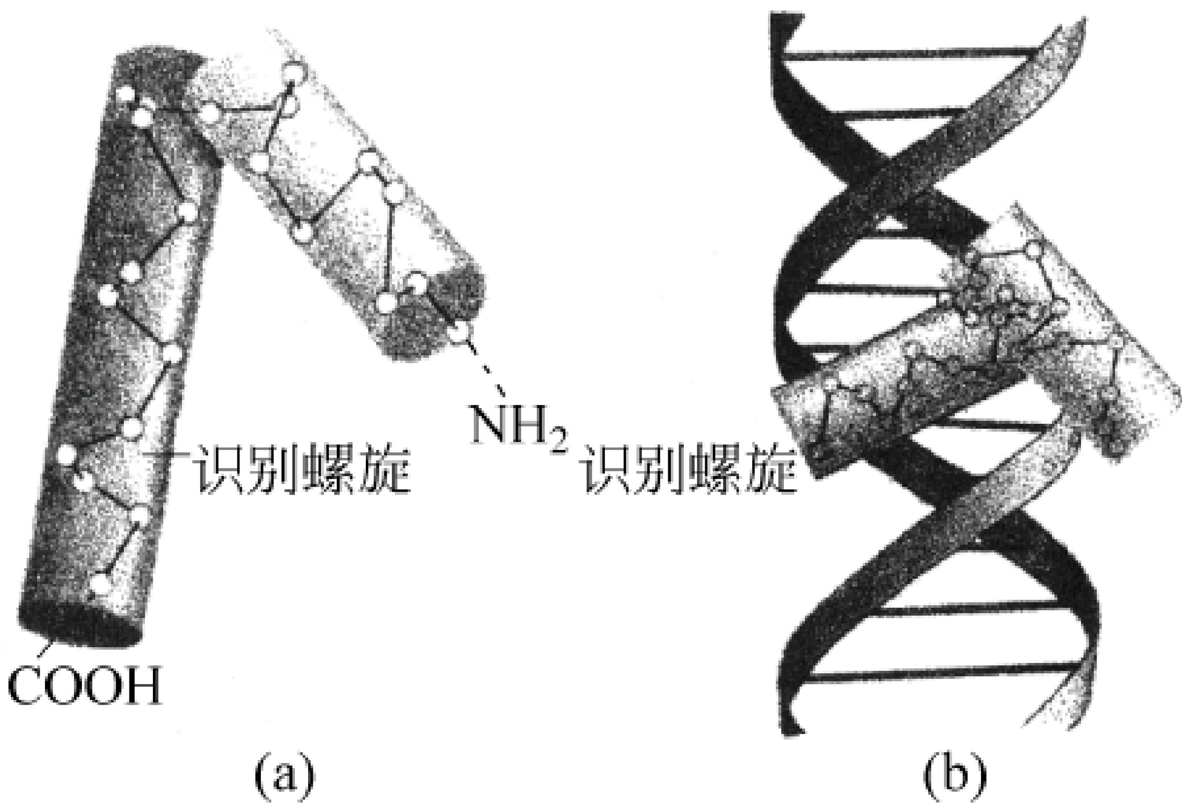


图 10.22　螺旋-转角-螺旋基序

(a) 螺旋-转角-螺旋基序结构;(b) HTH 与 DNA 双螺旋大沟作用

(2) 锌指

1985 年在进行 DNA 聚合酶Ⅲ的转录因子 TFⅢA 的氨基酸序列分析时发现了 9 个重复的 30 个氨基酸残基序列，每个序列都含有一个由两个 Cys 和两个 His 通过配位键与 Zn^{2+} 结合形成的四面体结构，由于配位使得 Cys20 和 His33 之间的 12 个氨基酸残基突出成环，像个手指，所以这样的 DNA 结合域形象地被称为锌指(图 10.23)。

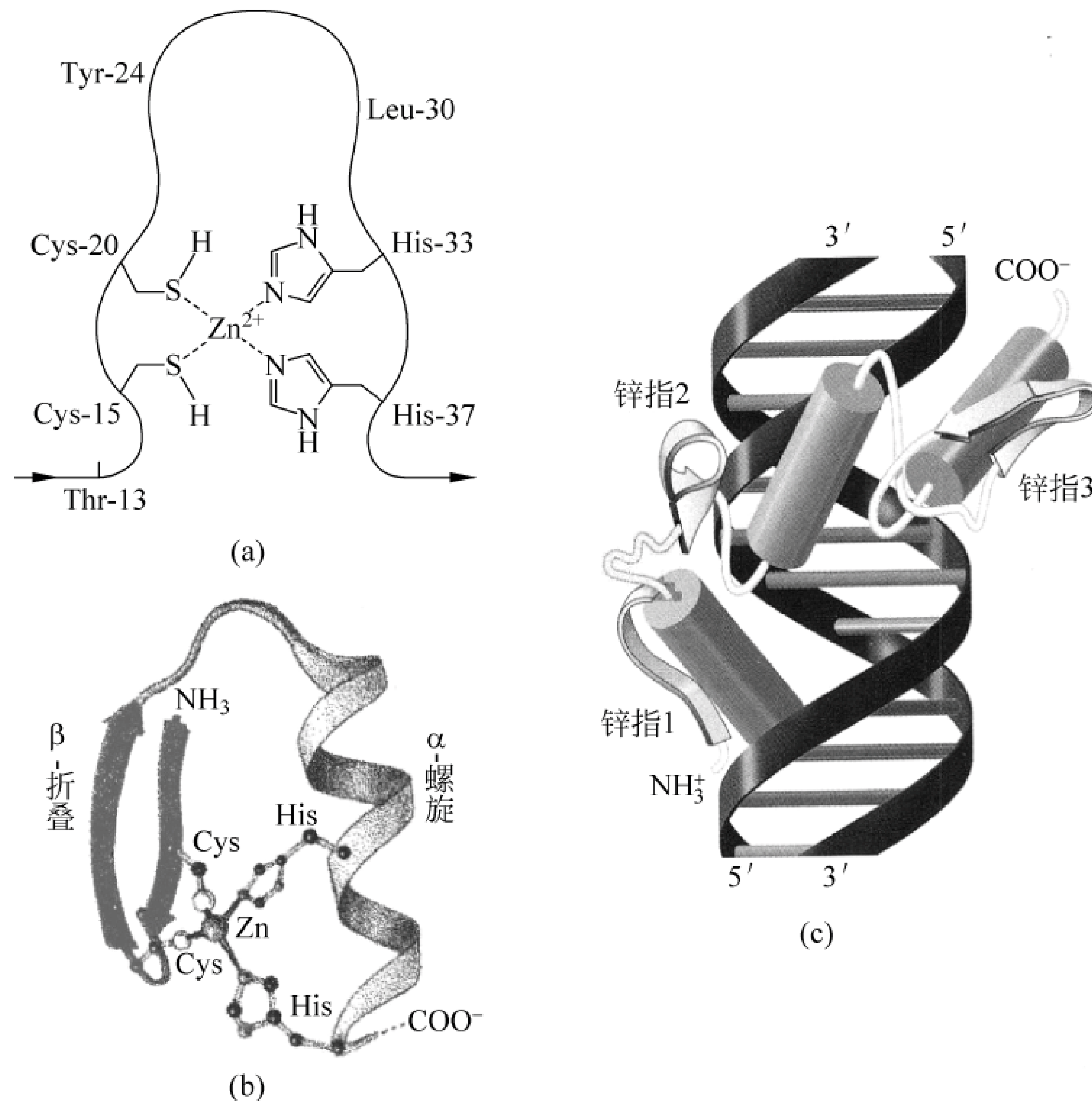


图 10.23 锌指

(a) 锌指中 Zn^{2+} 与两个 Cys 和两个 His 配位；(b) 锌指的二级结构；(c) 锌指作用于 DNA 的大沟

不同转录因子的锌指数目可从 2 个变化到 30 个以上，组成锌指串联的结构域。由两个 Cys 和两个 His 与 Zn^{2+} 配位的锌指也称为 C_2H_2 型锌指。还有一种 C_2C_2 型锌指，是 4 个 Cys 与 Zn^{2+} 配位。

单个锌指的二级结构含有一个 α-螺旋和一个 β 折叠片。含锌指结构的 DNA 结合蛋白都是通过锌指的 α-螺旋与 DNA 双螺旋大沟作用来影响转录。

(3) 亮氨酸拉链

第三类 DNA 结合域是亮氨酸拉链基序，该基序结构是一个由两个 α-螺旋形成两性的卷曲螺旋形 α-螺旋(coiled coil α-helix)，CREB 等许多转录因子都含有这种基序。亮氨酸拉链基序的最大特点是在 30～40 个氨基酸残基中每隔 6 个残基就出现一个 Leu。由于α-螺旋中每一转含有 3.6 个氨基酸残基，所以第 7 个残基基本上是处于 α-螺旋的同一侧[图 10.24(a)]。

位于两个 α-螺旋上的 Leu 相互靠近，通过疏水键相互作用使两个 α-螺旋缠绕在一起形成左手螺旋结构，一个 α-螺旋上的 Leu 压在另一个相邻 α-螺旋 Leu 的上面，像拉链那样交

织在一起形成一个二聚体,这样的结构形象地称之为亮氨酸拉链。带有亮氨酸拉链的转录因子通常都是以二聚体存在,二聚体除了富含 Leu 形成卷曲螺旋的部分外,还含有富含 Lys、Arg 和 His 碱性氨基酸的亲水区。二聚体通过亲水区与 DNA 的糖-磷酸之间的静电相互作用与 DNA 的大沟结合影响转录[图 10.24(b)]。

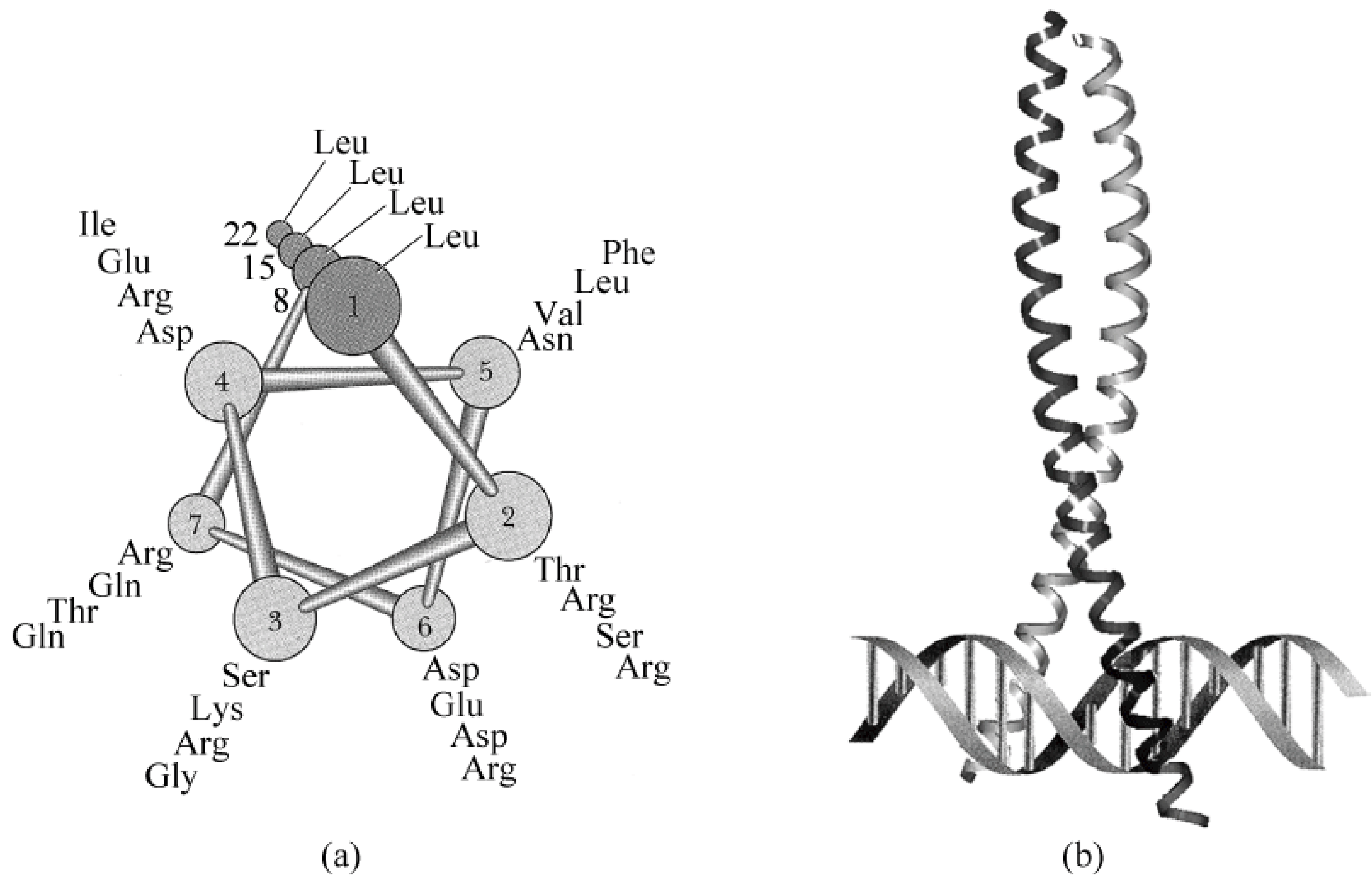


图 10.24 亮氨酸拉链基序

(a) 亮氨酸拉链中一条 α-螺旋轮结构的俯视图,Leu 出现在 α-螺旋的第 1、8、15、22 位置上,排列在螺旋一侧,形成一个疏水"脊";(b) 亮氨酸拉链通过亲水区与 DNA 的大沟结合

10.7 RNA 加工

转录的初级产物,也称为初级转录物不一定都具有功能,为了转变为具有功能的成熟 RNA,许多初级 RNA 都必须进行加工,例如通过外切或内切除去一些多余的核苷酸序列,5′端和(或)3′端进行修饰和添加序列,以及对序列中的特殊核苷酸进行修饰等。3 类主要的 RNA:mRNA、rRNA 和 tRNA 在原核细胞和真核细胞中都进行了不同程度的加工。

10.7.1 mRNA 加工

在原核生物中转录与翻译是协同的,但在真核生物中这两个过程空间上是分开的:转录发生在核内的 DNA,而翻译是在胞质溶胶中的核糖体进行的。因此,转录产物要转运到胞质溶胶去进行翻译,在这个过程中初级 mRNA 转录物要进行加工,转换为成熟的 mRNA。

高等真核生物中的大多数基因被分裂成称为外显子(exon)的编码区和称为内含子(intron)的非编码区。这些内含子是插入核苷酸序列,当初级 mRNA 加工为成熟 mRNA 时它们都将被除去,这样的基因通常被冠名为割裂基因(split genes)。因此,一个真核生物基因的表达不只是转录,也包括将初级转录物加工成它最后的成熟的 RNA(mRNA、tRNA 和 rRNA 等)。图 10.25 给出了一个割裂基因加工的过程。

割裂基因被转录为初级 mRNA 后,经历 5′端戴帽、3′端加上 Poly(A)和除去内含子的剪接等 3 个加工过程形成成熟 mRNA。

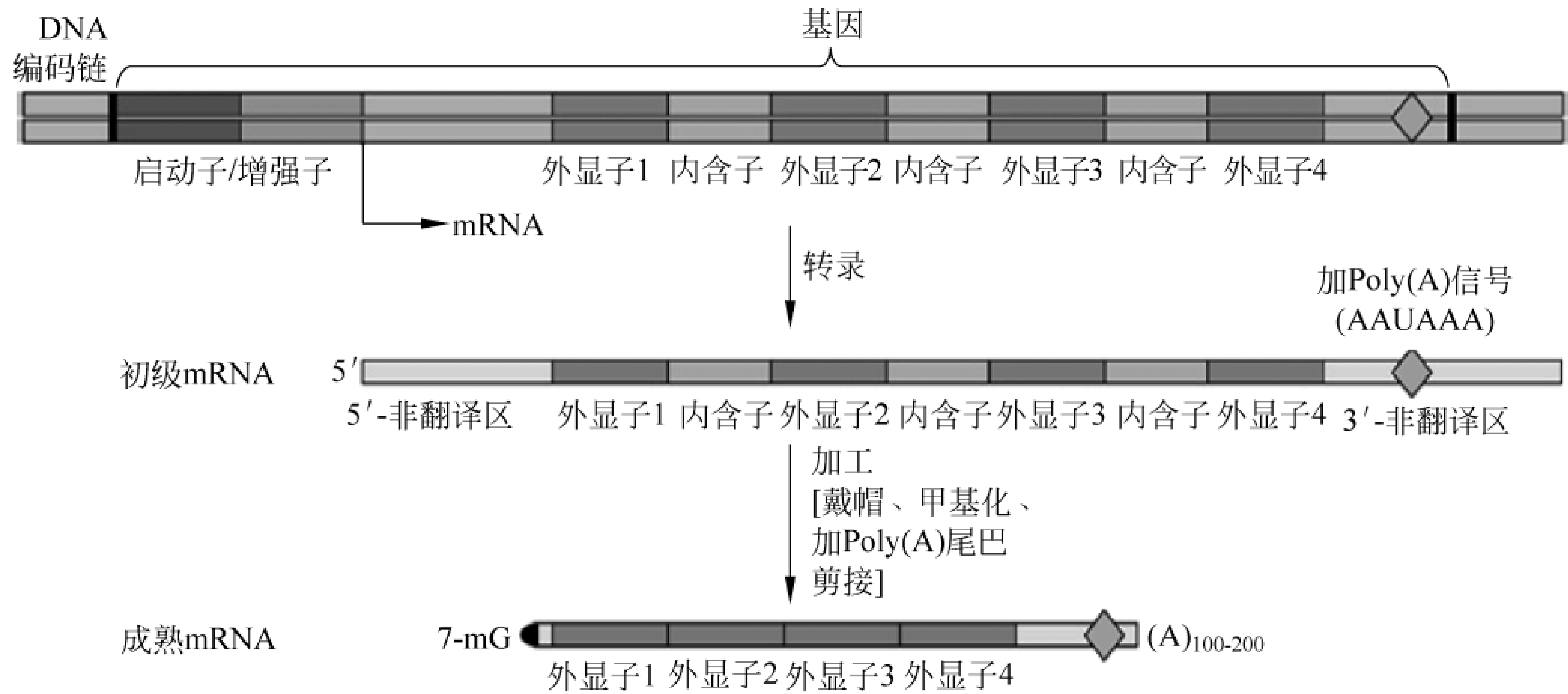


图 10.25 真核生物中割裂基因的加工过程

1. 戴“帽子”

在初级 mRNA 合成起始后不久(约延伸到 20 个核苷酸),以 GTP 作为底物,在核内鸟苷酰基转移酶(guanylyl transferase)和甲基转移酶(methyltransferase)催化下,将一个称为“帽子”结构的稀有的 7-甲基鸟嘌呤加到 5′端核苷酸前,两者之间通过一个少有的 5′-5′三磷酸键连接(图 10.26)。mRNA 上的 5′帽子对于蛋白质合成的起始很重要,同时它可保护转录出的 mRNA 不被 5′-核酸外切酶降解。

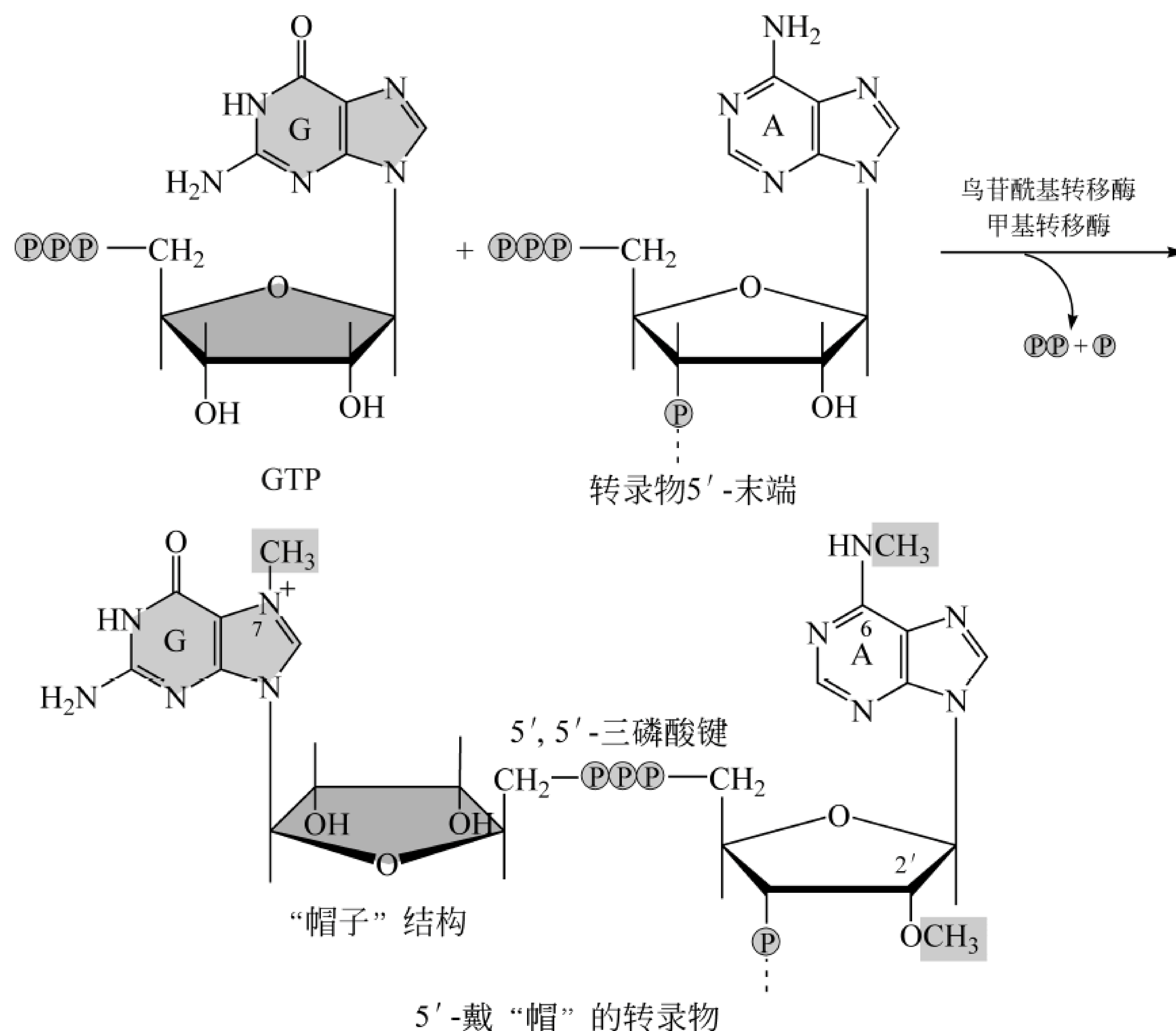


图 10.26 初级 mRNA 的 5′端戴“帽子”

“帽子”结构为 7-甲基鸟苷;与帽子相邻的第一个核苷酸为腺苷酸,其中 2′处甲基化,嘌呤 N^6 甲基化;含有 P 的圆圈代表磷酸基团

2. 加“尾巴”

初级 mRNA 3′端带有一个加 Poly(A)信号 AAUAA,当 RNA pol Ⅱ转录出 AAUAA 后,切割-聚腺苷酰化特异因子(cleavage-polyadenylation specificity factor,CPSF)识别并结合该序列,形成一个含有 RNA 内切核酸酶的复合物。内切核酸酶在 AAUAA 下游 10～35 核苷酸切割形成新 3′端。然后,在 poly(A)聚合酶(被 CPSF 激活)催化下,在新 3′端加上由 200～250 个腺苷酸组成的 poly(A)“尾巴”。

3. 剪接

研究发现许多外显子与内含子连接处都有类似序列,在内含子的 5′端一般都含有 GU,而在内含子 3′端存在 AG 序列,剪接正是利用外显子和内含子交界处的特殊序列,通过两个转酯反应完成的:一个是 5′剪接位点与分支点腺苷酸残基之间,另一个是 5′外显子与 3′剪接位点之间的反应(图 10.27)。经过两个反应,切下了内含子[套索结构(lariat structure)形式],形成连在一起的外显子。剪接反应由称为剪接体(spicesome)的 RNA-蛋白复合物催化。

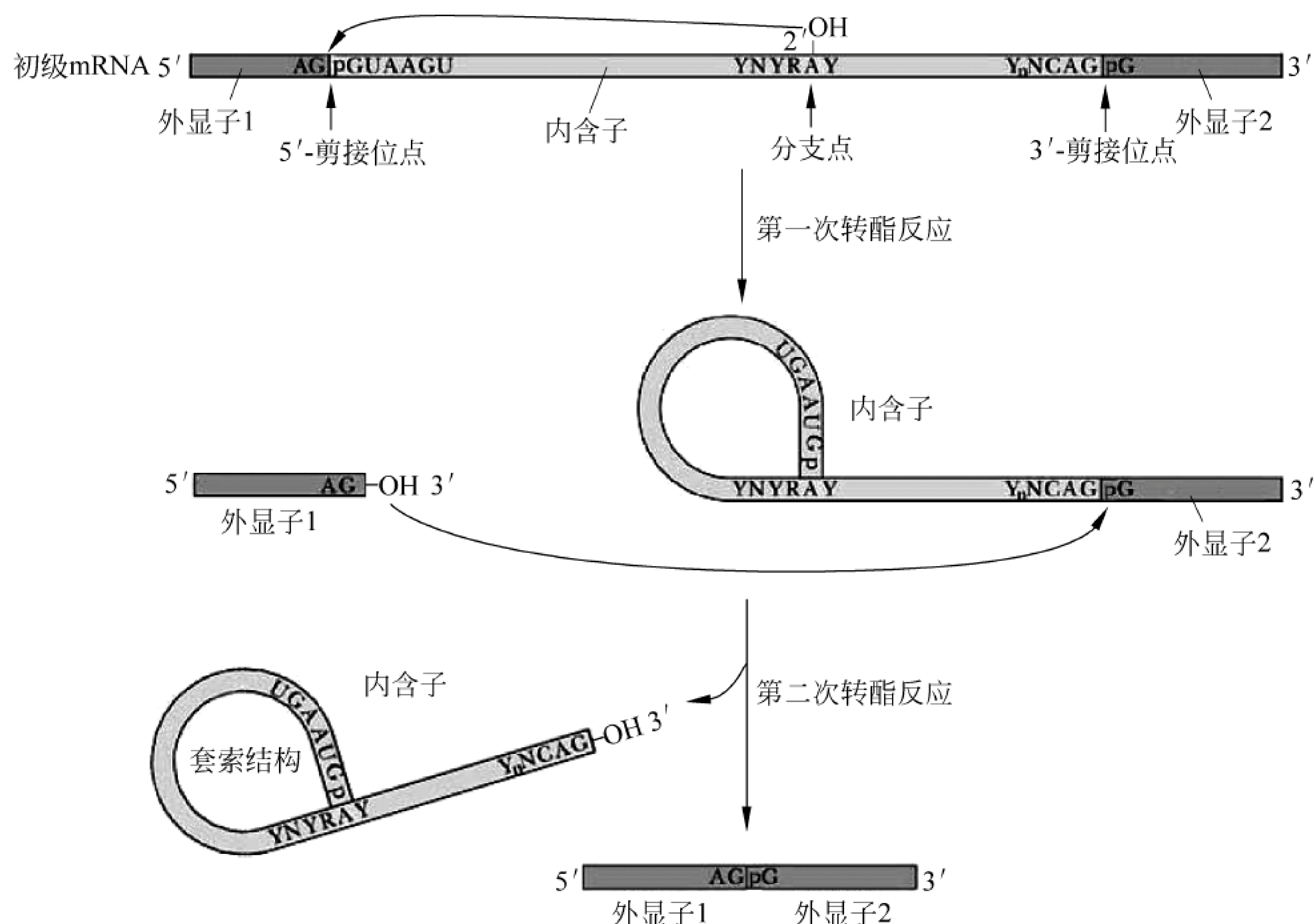


图 10.27　两步转酯反应的剪接过程

R 和 Y 分别代表嘌呤和嘧啶核苷酸残基,N 代表任一核苷酸残基

剪接体是大的多亚基复合物,含有 100 种以上蛋白质和 5 种核内小 RNA(small nuclear RNA, snRNA)。这些 snRNA 与蛋白质组合形成 5 种核内小核糖核蛋白(small nuclear nucleoproteins,snRNP):U1 snRNP、U2 snRNP、U5 snRNP 和 U4/U6 snRNP(U4 和 U6snRNA 通过碱基配对结合在一起),它们与内含子形成剪接体。

首先 U1 snRNP 与 5′剪接位点结合,然后 U2 snRNP 结合内含子中的分支点(图 10.27 中腺苷酸残基 A)。接下来当 3′剪接位点出现在转录物复合物时,U5 snRNP 与它结合。U4/U6 snRNP 形成一个复合物,与所有的 snRNP 组装成剪接体。经第一次和第二次转酯反应后,切除内含子,然后剪接体解体。

相关话题　基因“敲除”

基因“敲除”主要是应用 DNA 同源重组原理，将一个基因片段替换为已灭活的该基因同源片段，从而达到基因敲除，研究基因功能的目的。灭活可通过将一个外源基因(例如，常用的标记基因 *neo*)插入到靶基因拷贝内一个外显子来实现，*neo* 是一个 G418(氨基糖苷类抗生素)抗性基因。携带了 *neo* 的转基因与野生型小鼠胚胎干(ES)细胞中 DNA 之间的同源重组导致灭活的转基因取代了靶基因(图 10.28)。发生同源重组的 ES 细胞对 G418 有抗性，挑选出这样的细胞。然后将这些重组 ES 细胞注射入早期阶段小鼠胚胎中。在这个小鼠的配子内将存在一个不能转录的灭活靶基因。雄性小鼠与带有灭活靶基因的雌性小鼠之间交配生出纯合的“敲除”小鼠的下一代，即缺失了靶基因功能的小鼠。这些敲除小鼠的特征就揭示了该基因管控的那些生理功能。

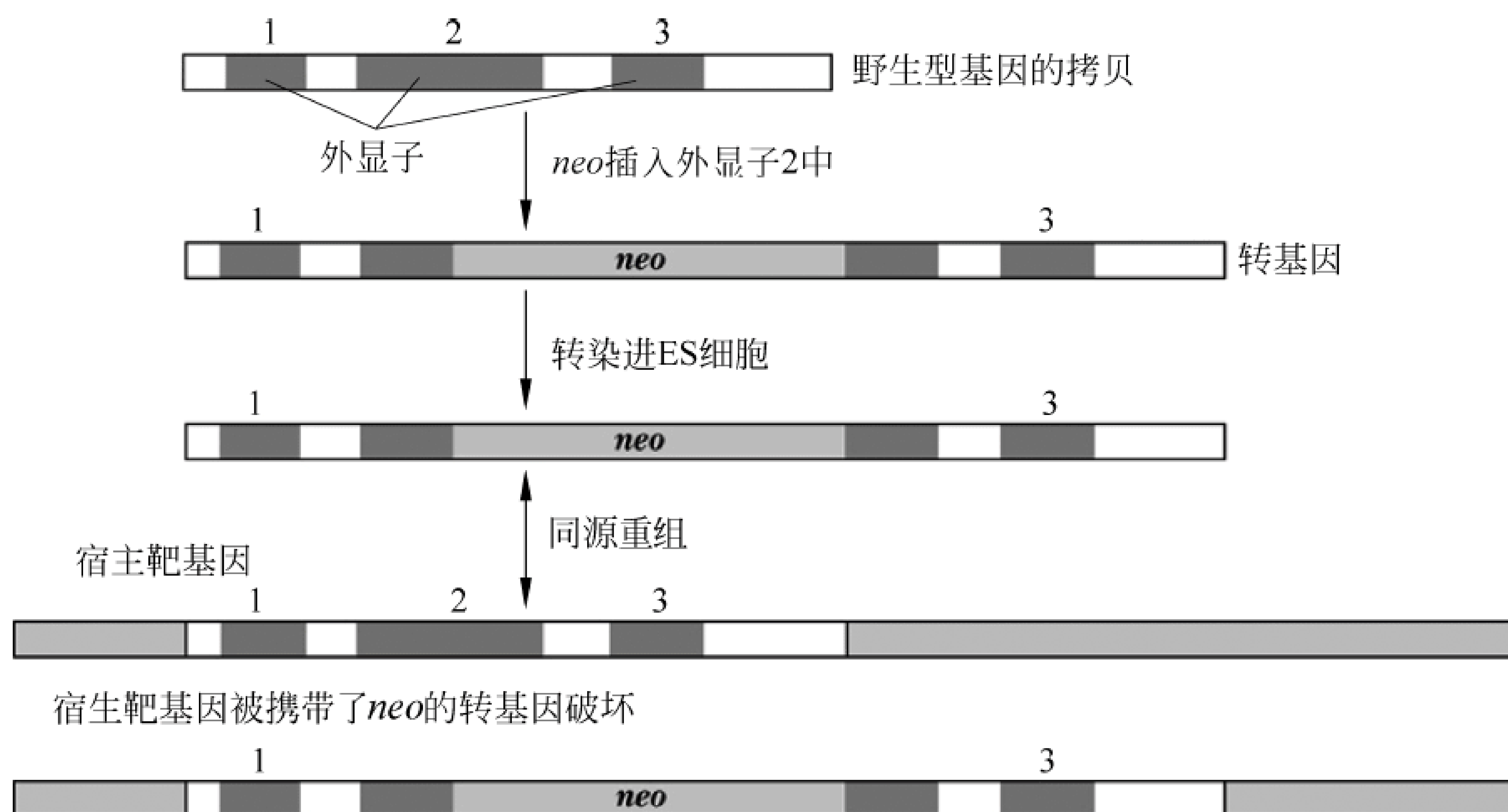


图 10.28　含有 *neo* 的转基因与野生型 ES 细胞基因的同源重组

10.7.2　rRNA 加工

初级 rRNA 的剪接有两种方式，一种是利用核酸酶进行剪接，另一种是 Cech T 发现的可自我剪接的 rRNA。

1. 核酸酶剪接

E. coli 中的初级 rRNA 编码 23S、16S rRNA 和小的 5S rRNA，同时还编码几种 tRNA。初级 rRNA 产物的剪接是通过特殊的核酸酶完成的。这些核酸酶包括 RNaseⅢ、RNase P、RNase E 和 RNase F，以及 RNase M16、RNase M23 和 RNase M5(图 10.29)。

2. 自我剪接：核酶

1982，Cech T 发现四膜虫(tetrahymena)初级 rRNA 转录物不需要通常的核酸酶，可自我催化完成剪接，Cech 将这种具有催化功能的 RNA 称为核酶(ribozyme)。

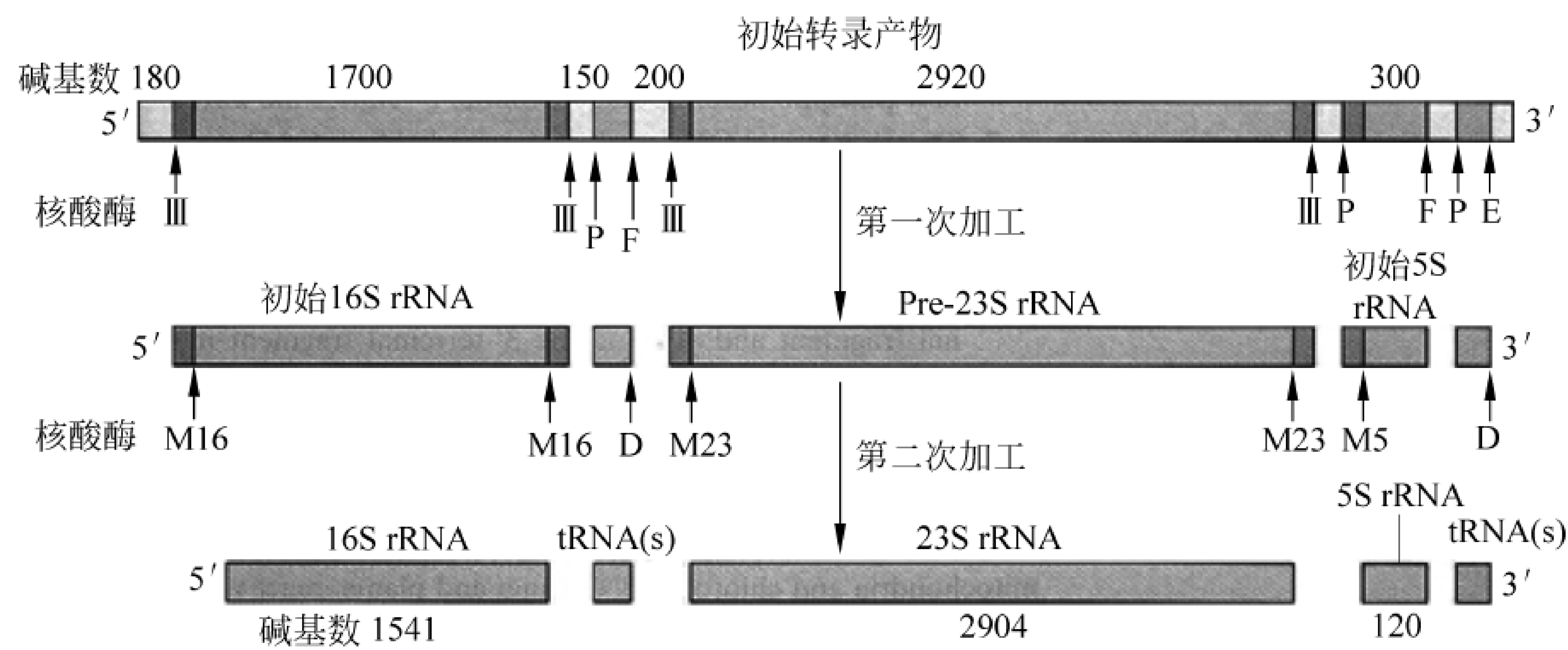


图 10.29 *E. coli* rRNA 加工

当将从四膜虫分离出来的初级 rRNA 转录物只与游离的鸟苷酸温育时，一个含有 413 个核苷酸的内含子被自我剪除，并且外显子拼接在一起(图 10.30)。

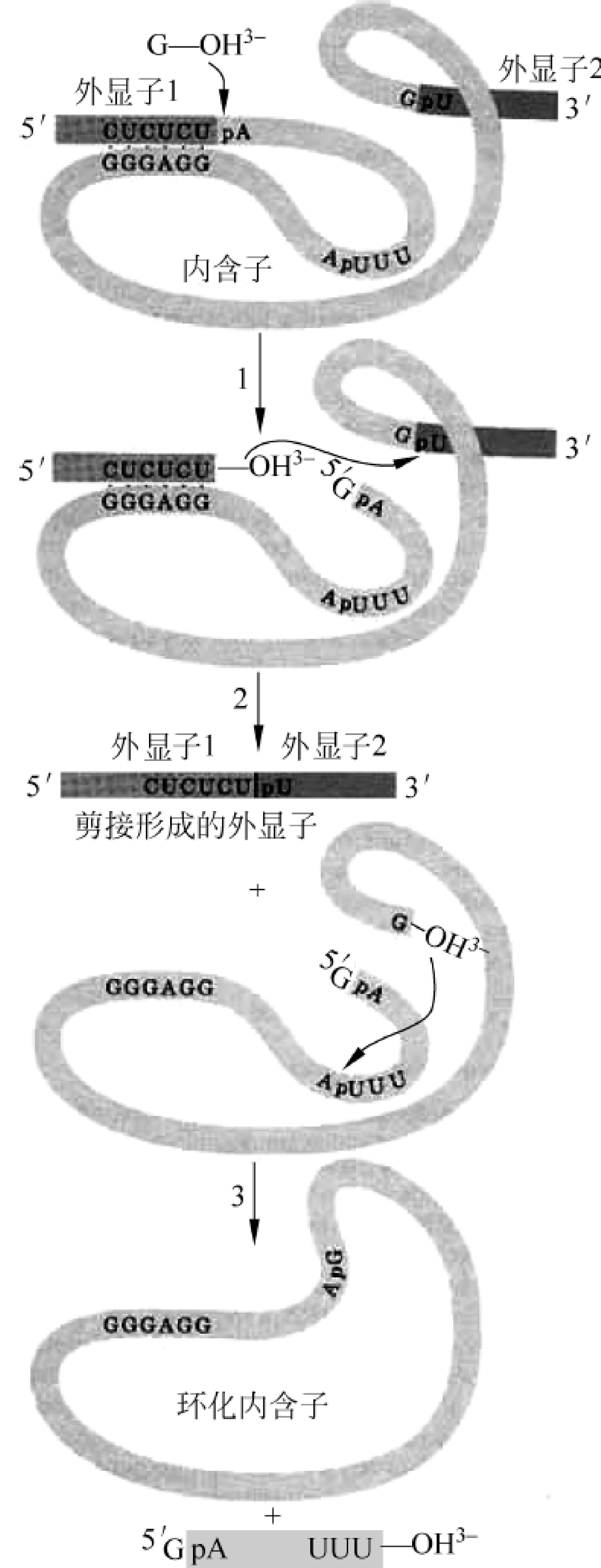


图 10.30 四膜虫初级 rRNA 自我剪接反应过程

自我剪接类似于初始 mRNA 的加工过程，可分为 2 步反应描述。

（1）鸟苷酸的 3′羟基对内含子 5′端和外显子之间的 3′，5′-磷酸二酯键进行亲核攻击，结果与内含子中的 5′核苷酸形成一个新的 3′，5′-磷酸二酯键，释放出上游外显子 1。

（2）外显子 1 的 3′羟基作为一个亲核体攻击外显子 2 的 5′-磷酸，形成一个新的 3′，5′-磷酸二酯键，将两个外显子共价连接在一起，并释放出内含子。鸟苷酸作为反应中的一个辅助因子，没有掺入到外显子中。

10.7.3　tRNA 加工

无论是真核生物，还是原核生物，成熟的 tRNA 都是通过对初级 tRNA 转录物加工产生的。图 10.31 给出了转录后的酵母初级 $tRNA^{Tyr}$（专门负载 Tyr 的 tRNA）的加工过程。首先在核酸酶催化下除去 5′端 19 个多余核苷酸。然后在 tRNA 核苷酰基转移酶催化下依次将 C、C 和 A 加到 $tRNA^{Tyr}$的 3′末端，再通过还原、甲基化和脱氨等反应对 $tRNA^{Tyr}$的一些特定碱基进行修饰，最后通过核酸内切酶、激酶、连接酶和磷酸酯酶催化除去 14 个间插核苷酸（内含子），形成成熟的 $tRNA^{Tyr}$。

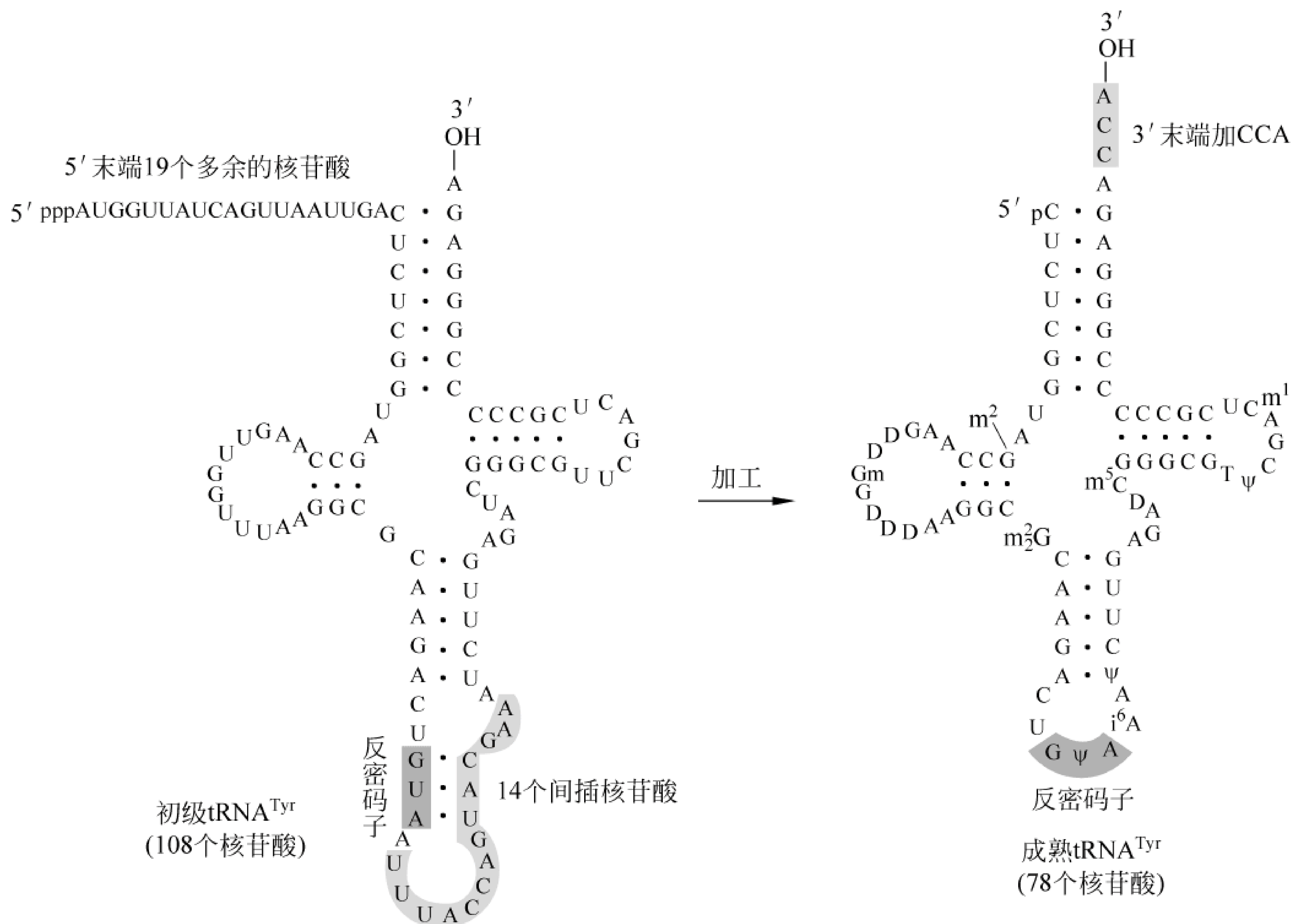


图 10.31　酵母 $tRNA^{Tyr}$转录后的加工

m^2G：N^2-甲基胞苷，D：二氢尿嘧啶核苷，Gm：2′-甲基鸟苷，G_2^2：N^2，N^2-二甲基鸟苷，ψ：假尿嘧啶核苷，i^6A：N^6-异戊基腺苷，m^5C：5-甲基胞苷，m^1A：1-甲基腺苷，T：核糖胸腺嘧啶核苷

小结

1. DNA指导的RNA合成,也称为转录是由RNA聚合酶催化的。RNA聚合酶沿着DNA中的模板链移动,将新进入的底物核苷三磷酸的5′磷酸连接到原有RNA的3′末端残基的3′-OH上。

2. 转录开始于启动子序列,沿着5′→3′方向进行。*E.coli* RNA聚合酶的σ亚基识别并结合启动子,起始转录。在起始时,一个转录泡形成,并合成了一段短的RNA。在由起始向链延伸转换时σ亚基脱离。RNA核心酶完成余下RNA的合成。

3. *E.coli* 中存在两种类型的转录终止机制:一种是内在转录终止,依靠转录产物形成发卡结构使转录终止。另一种是依赖ρ因子的终止机制,依靠ρ因子解旋酶活性使DNA∶RNA杂化体解离,终止转录。

4. 真核生物中,几种不同RNA聚合酶执行转录任务,转录因子与启动子和RNA聚合酶作用起始转录。

5. 原核生物中转录调控包括阻遏作用、代谢物抑制作用调控和弱化作用调控。真核生物转录因子中DNA结合域包括螺旋-转角-螺旋、锌指、亮氨酸拉链和螺旋-环-螺旋。

6. 真核生物中mRNA的加工包括5′端戴"帽子"和3′端加poly(A)尾巴。然后通过剪接除去内含子,并将外显子拼接在一起。rRNA和tRNA的初级转录物都需要通过核酸酶切割和共价修饰进行加工。

习题

1. 将正在进行转录和RNA加工的真核细胞与^{32}P标记的ATP温育。那么在成熟mRNA的哪个部位会出现放射性核素?假设^{32}P标记在ATP的(a)α位;(b)β位;(c)γ位。

2. 一种细菌的RNA聚合酶以70个核苷酸/秒的速度延长RNA,每个转录复合物覆盖DNA的70bp。

(a) 从一个6000bp基因每分钟最多可生产出多少RNA分子?

(b) 一次最多能有多少转录复合物同时结合于此基因上?

3. 与DNA聚合酶不同,RNA聚合酶没有校正活性,试解释为什么缺少校正功能对细胞并无害处。

4. 3′-脱氧腺苷-5′-三磷酸是ATP的类似物,假设它相似到不能被RNA聚合酶识别为错误的核苷酸。如果在RNA转录时细胞中存在少量的该物质,会有什么现象?

5. 现在有各种各样的方法可使你能将完整的真核基因导入到一个原核细胞,你预测这个基因能否被原核RNA聚合酶完全转录?反过来,如果将一个完整的原核基因引入到真核细胞中,该基因能否被真核转录复合物完全转录?

6. 假设,存在一个稀有的例子,一个典型的丙糖磷酸异构酶基因含有允许在原核细胞中精确转录的恰当序列,生成的RNA是否能正确翻译成完整的酶?

7. 一般来说,如果知道了一个基因的基因组DNA序列,我们可准确预测出该基因编码的RNA的核苷酸序列。这一说法适用于原核生物的tRNA吗?适用于真核生物的

tRNA 吗？

8. *E. coli* 基因组大小近似为 4600kbp（千碱基对），含有 4000 个基因。哺乳动物基因组大小近似为 3×10^6kbp，最多含有 50 000 个基因。*E. coli* 基因平均长度为 1000bp（碱基对）。

(a) 计算没被转录的 *E. coli* DNA 的百分比。没被转录的区域是哪些区域？

(b) 尽管许多哺乳动物的基因比细菌基因大，但大多数哺乳动物基因产物大小类似于细菌基因产物。计算哺乳动物基因组中外显子 DNA 的百分比。

9. 编码血红蛋白 α 链和 β 链的基因都含有内含子（即它们都是割裂基因），如果你打算将编码 α 链的基因导入细菌质粒中并在细菌中表达，该怎么做？

10. RNA 自我剪接反应和 RNA 作为催化剂的反应之间的区别是什么？

11. 假设玉米丙糖磷酸异构酶基因（约 3400bp）的第一个内含子几乎刚被转录出（即合成了 RNA 的约 500 个核苷酸之后），一个剪接体就组装在该内含子处。如果剪接反应直到转录终止才发生，剪接体应当稳定多长时间？假设玉米 RNA 聚合酶Ⅱ的转录速度为每秒 30 个核苷酸。

12. 来自真核细胞的成熟 mRNA 通常可以使用含有聚（dT）纤维素的柱子从细胞中的其他成分中纯化。这些柱子含有可附着在纤维素基质的单链脱氧核糖胸苷酸残基（聚 dT）的短片段。请解释利用这些柱子由混合成分纯化成熟 mRNA 的道理。

11 蛋白质合成

根据分子遗传学中心法则，转录可以生成 rRNA、tRNA 和 mRNA，其中的 mRNA 可以被翻译成蛋白质。mRNA 为核苷酸序列，而蛋白质是氨基酸序列，核苷酸残基序列是如何确定氨基酸序列的呢？George Gamow 认为 DNA 中的遗传信息是以一种密码形式存在的；而 Francis Crick 认为存在着一个与核酸和氨基酸都能相互作用的适配器(adapter)分子，既破译储存于 DNA 中的遗传信息，又能结合相应氨基酸的核酸分子。

后来研究证实上述两种假说都是正确的，核酸中的核苷酸残基序列是按照遗传密码确定蛋白质中氨基酸序列的，而且密码在几乎所有的生物中都是通用的。mRNA 上的遗传密码翻译成氨基酸序列要借助于 tRNA，这些 tRNA 分子就是 Crick 所说的适配器，它将储存在 mRNA 中的遗传信息与多肽的一级序列联系起来。

本章先从遗传密码的破译和 tRNA 的结构开始，然后描述蛋白质合成。

11.1 遗传密码

George Gamow 首先提出了遗传密码的基本结构单元：三联体核苷酸为一个密码子。他的理由是核苷酸残基序列决定了氨基酸的顺序，A、T、C 和 G 4 种核苷酸编码了 20 种氨基酸，其中存在着一种密码(codon)关系。如果由 4 种中任意 2 个或 3 个核苷酸作为编码单元，可分别形成 16 个(4^2)或 64 个密码子($4^3=64$)。显然 16 个密码子不够，而 64 个密码子编码 20 种氨基酸绰绰有余。后来 3 个不同的实验证明遗传密码子是由 mRNA 上 3 个连续的核苷酸残基构成，因此称为三联体密码子(triplet codon)。

遗传密码的破译利用了从一种固氮菌中得到的多核苷酸磷酸化酶和无细胞翻译体系。该体系指的是将 *E. coli* 温和破碎，离心去除细胞壁和细胞膜，再加入核酸酶将原有 DNA、mRNA 降解后得到的包括核糖体、酶及其他的蛋白质合成所需组分的粗提液。如果在粗提液中加入纯化的或人工合成的 mRNA 及 ATP、GTP 和氨基酸就可以恢复合成多肽的能力。

1961 年 M. Nirenberg 和 H. Matthaei 等将多聚(U)和核素标记的氨基酸加入到无细胞翻译体系，发现多聚(U)导致多聚 Phe 的合成，确认 UUU 必然编码 Phe。多聚(A)和多聚(C)的实验分别得到了多聚 Lys 和多聚 Pro，确认了 AAA 是 Lys 的密码子，而 CCC 是 Pro 的密码子。

1964 年 Nirenberg 和 Philip Leder 又利用与核糖体结合的 tRNA 不能通过硝酸纤维素膜，而游离的 tRNA 可以通过的现象，分析滞留的 tRNA 上负载的氨基酸，由此确定了与已知核苷酸三聚体结合的 tRNA 上连接的是哪一种氨基酸。该实验对于几种密码子编码同

一个氨基酸提供了直接的、最有力的证据。

对遗传密码做出重要贡献的还有 Khorana，他化学合成了已知的重复的核苷酸序列，例如 UCUCUCUC…，然后加入到无细胞翻译体系，生成 Ser-Leu-Ser-Leu-…。确认 UCU 编码 Ser，而 CUC 编码 Leu。Khorana 通过类似实验确认了许多密码子，并填补了 Nirenberg 等遗漏掉的密码子。

1966 年，全部密码子都被破译，共有 64 个密码子，其中 61 个密码子是编码氨基酸的，其余 3 种是终止密码子。表 11.1 给出了 *E. coli* 中用于蛋白质合成的遗传密码，其中绝大多数的密码子也出现在哺乳动物细胞内的 mRNA 中。

表 11.1　*E. coli* 中用于蛋白质合成的遗传密码子

第 1 位（5′末端）	第 2 位				第 3 位（3′末端）
	U	**C**	**A**	**G**	
U	UUU　Phe	UCU　Ser	UAU　Tyr	UGU　Cys	**U**
	UUC　Phe	UCC　Ser	UAC　Tyr	UGC　Cys	**C**
	UUA　Leu	UCA　Ser	**UAA　Stop**	**UGA　Stop**	**A**
	UUG　Leu	UCG　Ser	**UAG　Stop**	**UGG　Trp**	**G**
C	CUU　Leu	CCU　Pro	CAU　His	CGU　Arg	**U**
	CUC　Leu	CCC　Pro	CAC　His	CGC　Arg	**C**
	CUA　Leu	CCA　Pro	CAA　Gln	CGA　Arg	**A**
	CUG　Leu	CCG　Pro	CAG　Gln	CGG　Arg	**G**
A	AUU　Ile	ACU　Thr	AAU　Asn	AGU　Ser	**U**
	AUC　Ile	ACC　Thr	AAC　Asn	AGC　Ser	**C**
	AUA　Ile	ACA　Thr	AAA　Lys	AGA　Arg	**A**
	AUG　Met	ACG　Thr	AAG　Lys	AGG　Arg	**G**
G	GUU　Val	GCU　Ala	GAU　Asp	GGU　Gly	**U**
	GUC　Val	GCC　Ala	GAC　Asp	GGC　Gly	**C**
	GUA　Val	GCA　Ala	GAA　Glu	GGA　Gly	**A**
	GUG　Val	GCG　Ala	GAG　Glu	GGG　Gly	**G**

stop 为终止密码子

遗传密码子像其他核苷酸序列一样，也是按 5′→3′方向读写的，术语密码子通常指的是 mRNA 中的碱基三联体或者是用 T 代替 U 的 DNA 中的非模板链（编码链）中的碱基三联体。例如编码 Tyr 的 mRNA 中的一种碱基三联体密码子为 UAC，编码链中相对应密码子就是 TAC。

遗传密码具有以下一些显著的特点。

（1）所有密码子都是有意义的。64 个密码子中的 61 个编码氨基酸，余下的 UAA，UGA 和 UAG 3 个密码子没有编码任何一种氨基酸，称为无义密码子（nosense codons）。无义密码子并不是没有意义，它们是一种表示蛋白质合成到达终点的终止信号，被称为终止密码子（termination codons）。

编码蛋氨酸的 AUG 密码子还常担当蛋白质合成的起始密码子（initiation codon），有时编码 Val 的 GUG 密码子也充当起始密码子。

（2）密码子存在简并性。除了 Trp 和 Met 各只有一个密码子之外，其他的氨基酸都存

在一个以上密码子。例如Ser、Arg和Leu都各有6个密码子,Gly有4个密码子,而Lys也有2个密码子。同一种氨基酸存在几个密码子的现象称为简并性(degenerate)。编码同一个氨基酸的不同密码子称为同义密码子(synonymous codon)。密码的简并性可以减少碱基突变造成的有害效应,因为单个碱基的变化仍会是编码同一种氨基酸的另一个同义密码子。

(3) 序列类似的密码子往往表示同样的或化学性质类似的氨基酸。例如编码Gly的密码子的GGU、GGC、GGA和GGG可以表示为GGX,而UCX指定编码Ser,X为4种碱基中的任一种编码的氨基酸仍是同一种氨基酸,这一特征称为密码子第三碱基简并性(third-base degeneracy)。

另外,第2位带有嘧啶碱基的密码子有可能是编码带有疏水侧链的氨基酸,而第2位为嘌呤的密码子可能特指极性或带电荷的氨基酸。两个带负电荷的Asp和Glu的密码子都可用GAX表示,当X为嘧啶碱基时就是Asp密码子,当X为嘌呤时就是Glu密码子。

上述这些类似的共有序列有可能会减少因碱基突变对遗传造成的伤害,因为密码子中单个碱基的改变从氨基酸来看可能没有变化,或者是被另一个类似于原来氨基酸的氨基酸所取代。

很多年以来,人们认为表11.1列出的遗传密码是通用的"标准"的密码,这种共识是基于在基因工程中一种原核生物*E.coli*可以准确翻译人的基因的现象,可以说不管密码来源于细菌、酵母、蘑菇还是人类,同样密码子指导的都是同样氨基酸的合成。不过后来的研究表明,密码的通用性还是有些例外,例如在人线粒体中,UGA编码Trp,而不是终止密码子;AUA编码Met,而不是Ile;AGA和AGC是终止密码子,而不再是编码Arg的密码子。

在密码子表中,密码子是以三联体形式书写的,但在mRNA中是没有标点符号的,即mRNA核苷酸序列中的两个密码子之间没有任何起标点符号的核苷酸残基加以隔离,所以必须按正确的读框(reading frame)从一个正确的起点开始,一个不漏地按照5′→3′方向翻译,直至碰到终止密码子。如果插入或删除一个核苷酸残基,就会使该残基以后的读码发生错误,称为移码。由于移码引起的突变称移码突变(frameshift mutation)。

遗传密码一般不重叠。例如对于给出的一段mRNA上的核苷酸序列。

AUGCAUGCAUGC

如果按不重叠读码,在没有给定读框时,可有以下3种读码方式。

从第1个核苷酸读起:AUG CAU GCA UGC

从第2个核苷酸读起:A UGC AUG CAU GC

从第3个核苷酸读起:AU GCA UGC AUG C

已证明在绝大多数生物中读码规则是不重叠的,但在少数*E.coli*噬菌体的RNA基因组中,密码子有重叠。

11.2 tRNA

tRNA分子在蛋白质的合成中充当的是遗传密码的翻译,tRNA一方面要识别mRNA上的密码子,另一方面它还要负载该密码子编码的氨基酸。tRNA分子中识别并与密码子

配对的三联体核苷酸序列称为反密码子(anticodon)。

每一个细胞内至少含有 20 种 tRNA(一种氨基酸对应一种 tRNA),就是说每种 tRNA 应当能够至少识别一个 mRNA 密码子,才能满足它作为适配器的作用。

11.2.1 tRNA 的三维结构

最早确定的 tRNA 结构是 Holley 经 7 年努力确定的丙氨酸-tRNA 结构,他也因此贡献获得了 1968 年度诺贝尔生理学或医学奖。到目前为止人们已经确定了来自数百种生物的 tRNA 的核苷酸序列。大多数 tRNA 尽管所含核苷酸残基数(60~95)及一级结构不同,但它们几乎都具有由一条核苷酸链形成的类似于三叶草形的二级结构(图 11.1)。

图 11.1 tRNA 三叶草式的二级结构

(a) 一般 tRNA 的二级结构;(b) 酵母丙氨酸-tRNA 碱基序列和二级结构;(c) 3 种稀有核糖核苷

D:二氢尿嘧啶核苷;ψ:假尿嘧啶核苷;I:次黄嘌呤核苷;mG:甲基鸟苷;m_2G:二甲基鸟苷;mI:甲基次黄嘌呤核苷;T:核糖胸腺嘧啶核苷

tRNA三叶草形二级结构都有一些共同的特征：4个通过氢键链内碱基配对形成的臂和一个可变环(variable loop)。每个臂都可形成一个短的、碱基堆积的类似于A-DNA结构的右手双螺旋。4个臂中有3个臂带有一个由未配对核苷酸残基组成的环。

tRNA分子5′端和3′端附近的碱基配对形成tRNA分子的受体臂(acceptor arm)或氨基酸臂(amino acid arm)，因为tRNA携带的相应氨基酸通过共价键就结合在3′末端核苷酸残基的3′或2′羟基上。氨基酸臂对面是反密码子臂(anticodon arm)，带有一个反密码子环(anticodon loop)，环中含有由3个连续核苷酸残基组成的与mRNA中相应密码子配对的反密码子(anticodon)。

tRNA分子的另外两个臂是根据臂中含有修饰的核苷酸而命名的：一个是TψC臂，因带有一个含有核糖胸腺嘧啶(T)(在RNA中很少见到)、假尿嘧啶(pseudouridine，ψ)和胞嘧啶(C)碱基的TψC环而得此名。另一个臂是D臂(D arm)，带有一个含2～3个稀有碱基二氢尿嘧啶(dihydrouridine，D)的D环，不同tRNA的D臂稍有不同。TψC臂和D臂对于整个tRNA分子的折叠起着重要的作用。

在反密码子臂和TψC臂之间，还含有由3～21个核苷酸残基组成的可变环(也称为额外环(extra loop))。另外，所有tRNA分子的5′端核苷酸都带有磷酸基团，而且5′末端的核苷酸残基大多为鸟苷酸残基(pG)。

在三维空间，tRNA分子折叠成倒L形，氨基酸臂位于L形分子的一端，反密码子臂则处于相反的一端(图11.2)。tRNA分子中的大多数核苷酸都处于两个成直角的、堆积的螺旋中。碱基之间堆积的相互作用就像稳定DNA双螺旋那样对tRNA的稳定性具有重要的贡献。

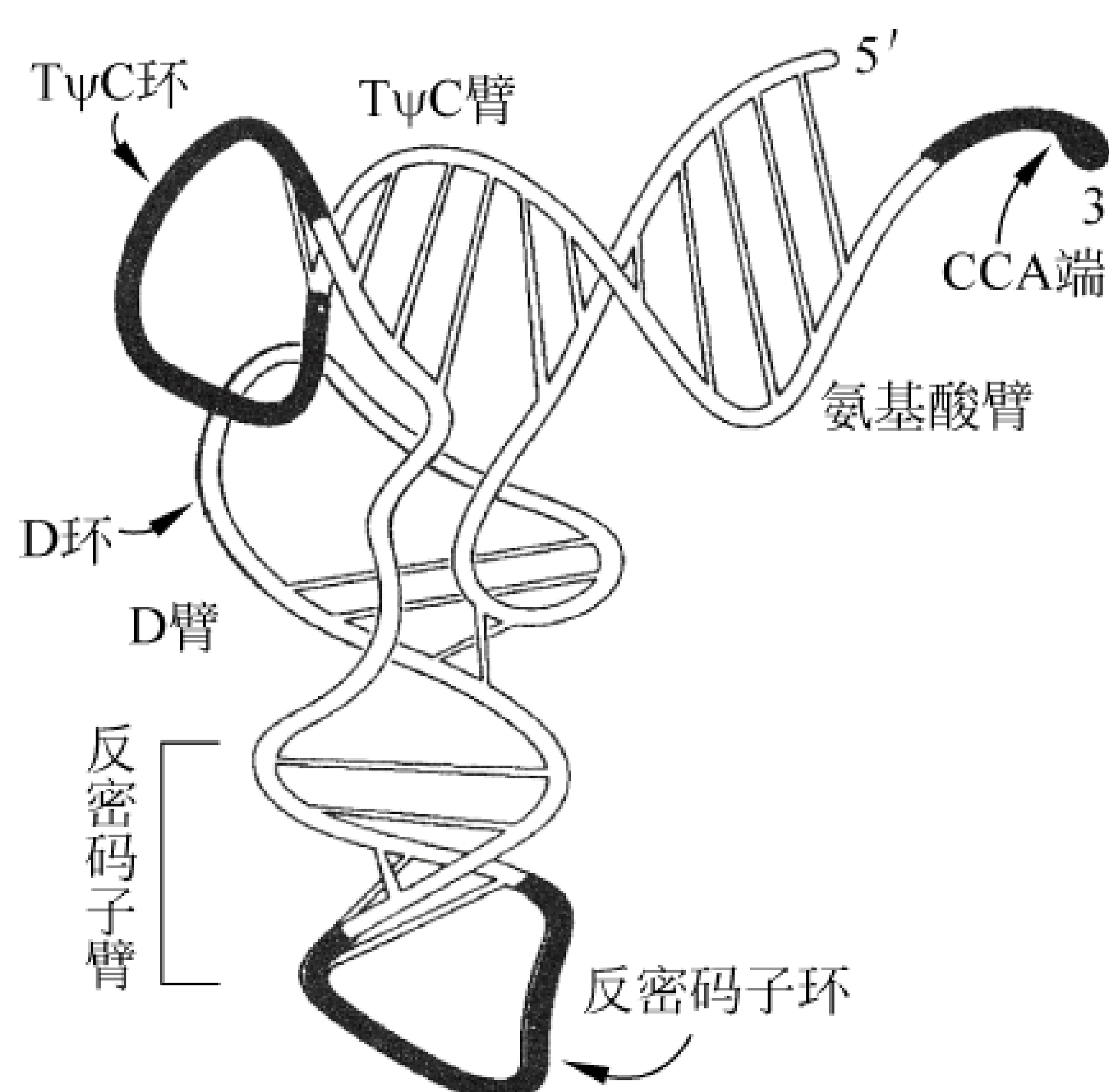


图11.2　tRNA的倒L形三级结构

11.2.2　“摆动”假说

tRNA中的反密码子与mRNA上的密码子互补碱基之间以反平行方式配对，即反密码子第1个碱基(5′端)与密码子3′端碱基配对。如果严格按照Watson-Crick碱基配对，一个tRNA的反密码子只能识别一个密码子，对于编码同一个氨基酸的每个密码子，都需要不同的tRNA，就是说不管是否存在简并性，61个密码子至少应当存在相应的61种不同的tRNA。然而研究发现某些反密码子能够识别一个以上的密码子，可能不需要那么多的tRNA。

其实早在1965年研究人员就发现携带苯丙氨酸的tRNA可识别编码Phe的UUU或UUC两个密码子。还发现特定的酵母$tRNA^{Ala}$也能够识别编码Ala的3个密码子GCU、GCC和GCA。Francis Crick研究了这些现象，并通过搭建的模型尝试着替换碱基配对的可能性。他提出了一种假说，即密码子的头两个碱基与反密码子的后两个碱基按照规范的Watson-Crick的A∶U或G∶C配对，但密码子的第3个碱基与反密码子的第1个碱基并不太遵守严格配对规则。就是说两者之间存在着一定的变通性或“摆动”(wobble)。因此，密码子的第3位碱基有时被称为摆动位置(wobble position)。

Crick 研究提出了一套密码子的第 3 位碱基与反密码子的第 1 位碱基之间的配对原则(表 11.2)。摆动规则表明反密码子的第 1 位碱基 U 可以识别位于密码子第 3 位的 A 或 G;反密码子的第 1 位 G 能够识别 U 或 C;反密码子的第 1 位 I[inosine(次黄嘌呤),I]可识别密码子的第 3 位 U,C 或 A(图 11.3)。摆动规则也预示着像 Pro 或 Thr 那样拥有 4 个密码子的家族至少需要两个不同的 tRNA。结合同一氨基酸的不同的 tRNA 分子称为同工 tRNA(isoacceptor tRNA)。

表 11.2　密码子的第 3 位碱基配对的可能性

反密码子的第 1 位碱基	识别的密码子第 3 位碱基
U	A,G
C	G
A	U
G	U,C
I	U,C,A

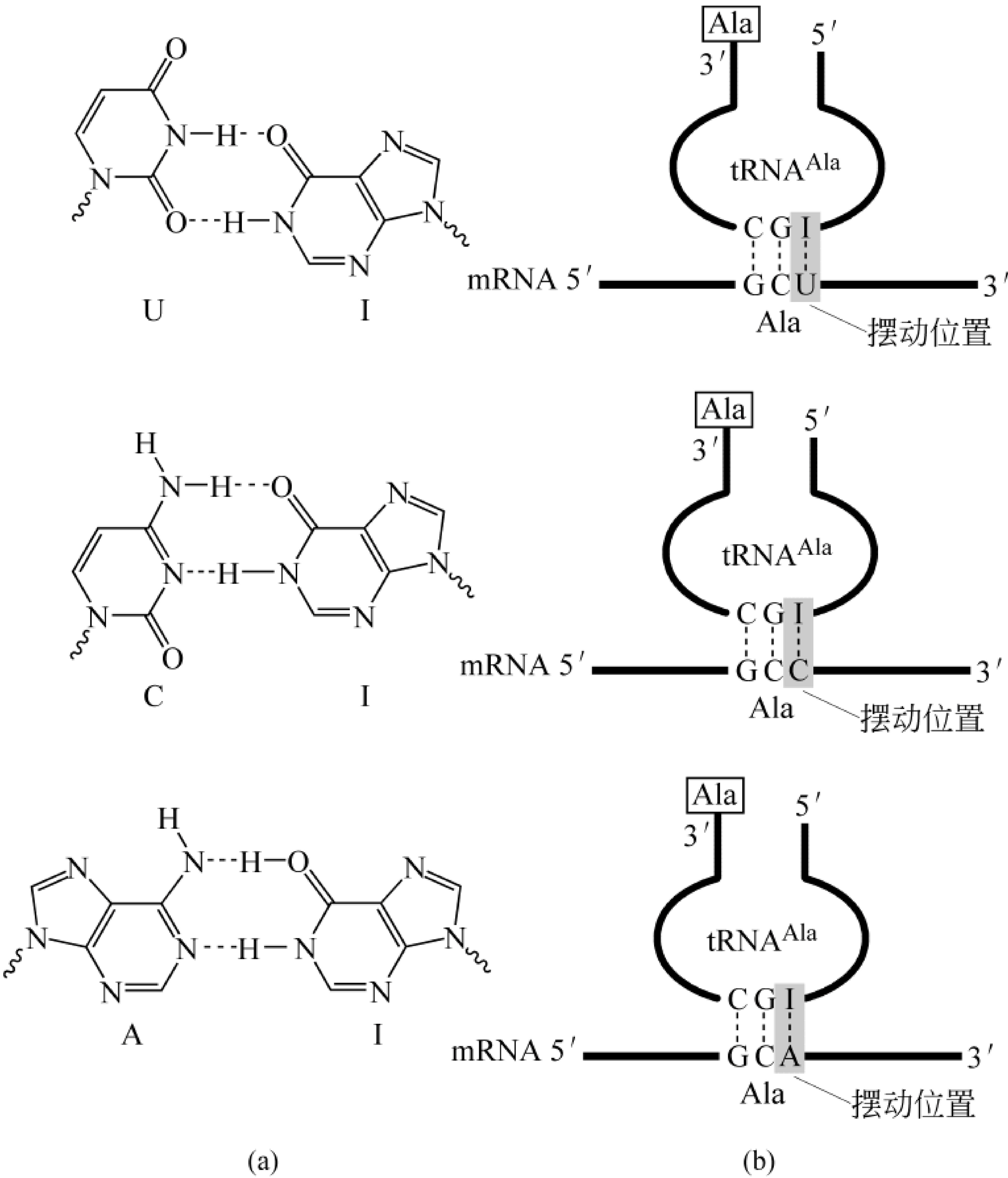


图 11.3　摆动位置的碱基配对

(a) 次黄嘌呤核苷酸(I)碱基配对,I 常常出现在 tRNA 的 5′(摆动)位,I 可以与 U,C 和 A 形成氢键;(b) 摆动位置处的碱基配对示意图,带有反密码子 IGC 的 $tRNA^{Ala}$ 分子可以与特异编码 Ala 的 3 个密码(GCU,GCC,GCA)中的任一个配对

摆动规则允许某些 tRNA 分子识别一个以上的密码子,密码子的摆动碱基决定了 tRNA 识别的密码子数目,识别简并密码子就不需要那么多的 tRNA 了。研究表明识别 61 个编码氨基酸的密码子至少需要 31 种 tRNA,如果加上识别肽链起始密码子 AUG 所需的一个单独的 tRNA,最低限度需要 32 种 tRNA。

11.3 氨酰-tRNA 的合成

像 DNA 和 RNA 合成那样,蛋白质合成也可明确地分为 3 个阶段:起始、链延伸和终止。然而,翻译还应包括聚合起始之前 tRNA 的氨酰化,这是一步使氨基酸激活的反应。一个特定的氨基酸经氨酰-tRNA 合成酶催化可以共价连接到相应 tRNA 分子的 3′端上,产物为氨酰-tRNA。氨酰-tRNA 是个高能分子,可以说氨基酸被激活为的是转移到生长着的多肽链上。常用 $tRNA^{AA}$ 表示可结合某种氨基酸的 tRNA 种类,例如可特异结合 Ala 的 tRNA 用 $tRNA^{Ala}$ 表示,而用 Ala-$tRNA^{Ala}$ 表示携带了丙氨酸的 $tRNA^{Ala}$。

由于存在着 20 种氨基酸,从理论上讲,大多数物种中每一个细胞中至少应当存在着 20 种氨酰-tRNA 合成酶。但也有少数生物中对于同一个氨基酸存在着两个不同的氨酰-tRNA 合成酶。某些细菌不含谷氨酰胺-和天冬酰胺-tRNA 合成酶,谷氨酰胺-tRNA 和天冬酰胺-tRNA 是通过对谷氨酰-$tRNA^{Gln}$ 和天冬氨酰-$tRNA^{Asn}$(分别由谷氨酰-tRNA 合成酶和天冬氨酰-tRNA 合成酶催化合成的)中的谷氨酸残基和天冬氨酸残基进行修饰合成的。

虽然一种合成酶对特定的氨基酸是特异的,但它能够识别数个同工 tRNA 分子。例如虽然存在着 6 个编码 Ser 的密码子和数个不同的同工 $tRNA^{Ser}$ 分子,但所有这些 $tRNA^{Ser}$ 都可被单一的丝氨酰-tRNA 合成酶识别。蛋白质合成的精确度取决于氨酰-tRNA 合成酶催化正确的氨基酸连接到相应的 tRNA 上的能力。

E. coli 中的 20 种氨酰-tRNA 合成酶已经鉴定出来了,每一种氨基酸都有一特定的氨酰-tRNA 合成酶。氨酰-tRNA 合成酶分为两类:Ⅰ类氨酰-tRNA 合成酶催化氨基酸连接在 tRNA3′末端腺苷酸(A)残基的 2′碳上;Ⅱ类氨酰-tRNA 合成酶将氨基酸连接到 A 的 3′碳上(表 11.3)。

表 11.3 *E. coli* 中两类氨酰-tRNA 合成酶

Ⅰ类氨酰-tRNA 合成酶	Ⅱ类氨酰-tRNA 合成酶
Arg	Ala
Cys	Asn
Gln	Asp
Glu	Gly
Ile	His
Leu	Lys
Met	Pro
Trp	Phe
Tyr	Ser
Val	Thr

在氨酰-tRNA合成酶的催化下，氨基酸通过氨基酸羧基与tRNA分子3′端腺苷酸残基核糖的2′或3′羟基之间形成的酯键连接到tRNA分子上。氨酰化反应是通过氨基酸激活和生成氨酰-tRNA两步反应，且两步反应由同一种氨酰-tRNA合成酶完成的(图11.4)。

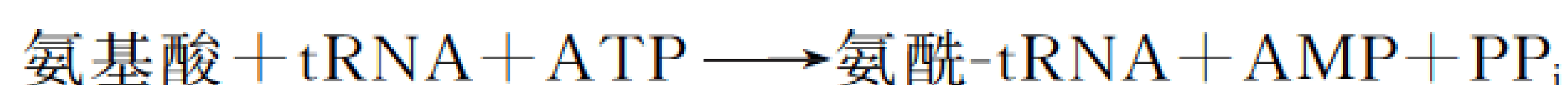


图11.4　氨酰-tRNA合成反应

第一步反应：氨基酸与ATP反应生成氨酰-AMP，第二步反应：在Ⅰ类氨酰-tRNA合成酶催化下，氨酰-AMP与tRNA反应生成2′氨酰-tRNA，然后经转酯生成3′氨酰-tRNA；或在Ⅱ类氨酰-tRNA合成酶催化下，氨酰-AMP与tRAN反应直接生成3′氨酰-tRNA

首先在氨酰-tRNA合成酶催化下，氨基酸与ATP生成氨酰-腺苷酸和PP$_i$(焦磷酸)，伴随着PP$_i$的水解，反应向有利于氨酰-AMP合成方向进行。然后，氨酰-AMP与tRNA反应，并将氨酰基转移到tRNA上2′或3′碳上。在Ⅰ类氨酰-tRNA合成酶催化下首先生成2′-氨酰-tRNA，然后经转酯再生成3′-氨酰-tRNA；在Ⅱ类氨酰-tRNA合成酶催化下直接生成3′-氨酰-tRNA。

由于在蛋白质合成的延伸过程中，不存在“校正”功能，所以最重要的是tRNA负载反

应不应该出现错误。研究发现每一种氨酰-tRNA合成酶都有识别相应氨基酸的能力,例如当Ile和Val处于同样浓度时,Ile-tRNA合成酶转移约50 000个Ile给$tRNA^{Ile}$,只转移一个Val给$tRNA^{Ile}$,精确度高得惊人。实际上Val和Ile结构上只相差一个亚甲基,Val应该很容易与Ile-tRNA合成酶的Ile结合位点结合,但酶选择的是多一个甲基的Ile。

另外,每一种氨酰-tRNA合成酶都能识别负载此氨基酸的tRNA,每一种tRNA分子都存在着氨酰-tRNA合成酶识别的特征元件,大都由位于tRNA上反密码子环和氨基酸臂两个区域的核苷酸组成,这些元件被人们认为是第二套遗传密码。

此外,每一种氨酰-tRNA合成酶都有将不正确连接的氨基酸通过水解除去,或是将不正确氨酰-tRNA水解掉的酶活性。

11.4 核糖体

蛋白质合成首先需要将核糖体、辅助蛋白、mRNA和氨酰-tRNA组装成精密的翻译复合物。核糖体在辅助蛋白帮助下催化肽键形成,mRNA携带指定蛋白质序列的信息,氨酰-tRNA携带激活的氨基酸。

所有核糖体都是由大小不同的两个亚基组成。在*E. coli*中,小亚基称为30S亚基,大亚基称为50S亚基(30S和50S指的是这些亚基的沉降系数),30S和50S亚基结合形成一个完整的70S核糖体(图11.5)。30S亚基含有16S rRNA(1542个核苷酸)(图11.6)和21种不同的核糖体蛋白质。50S亚基含有两个rRNA分子:5S rRNA(120个核苷酸)和23S rRNA(2904个核苷酸),另外还含有31种不同的蛋白质。



图11.5 原核生物和真核生物核糖体的比较

真核生物核糖体虽然形状上类似于原核生物,但更大、更复杂。一个完整的脊椎动物核糖体大小为80S,由40S和60S亚基组成。40S亚基含有一分子18S rRNA和30种蛋白质,而60S亚基含有40种蛋白质和三种rRNA:5S rRNA、28S rRNA和5.85S rRNA。

核糖体中有结合氨酰-tRNA的氨酰部位(aminoacyl site),简称A位;结合肽酰-tRNA的肽酰部位(peptidyl site),简称P位及转移肽酰基后留下的tRNA退出部位(exit site),简称E位3个部位。*E. coli*中A位和P位主要是由30S亚基和50S亚基共同组成的,而E位主要是由50S亚基组成的。图11.7给出了正在进行蛋白质合成过程中,P位和A位分别结合肽酰-tRNA和氨酰-tRNA的情形。

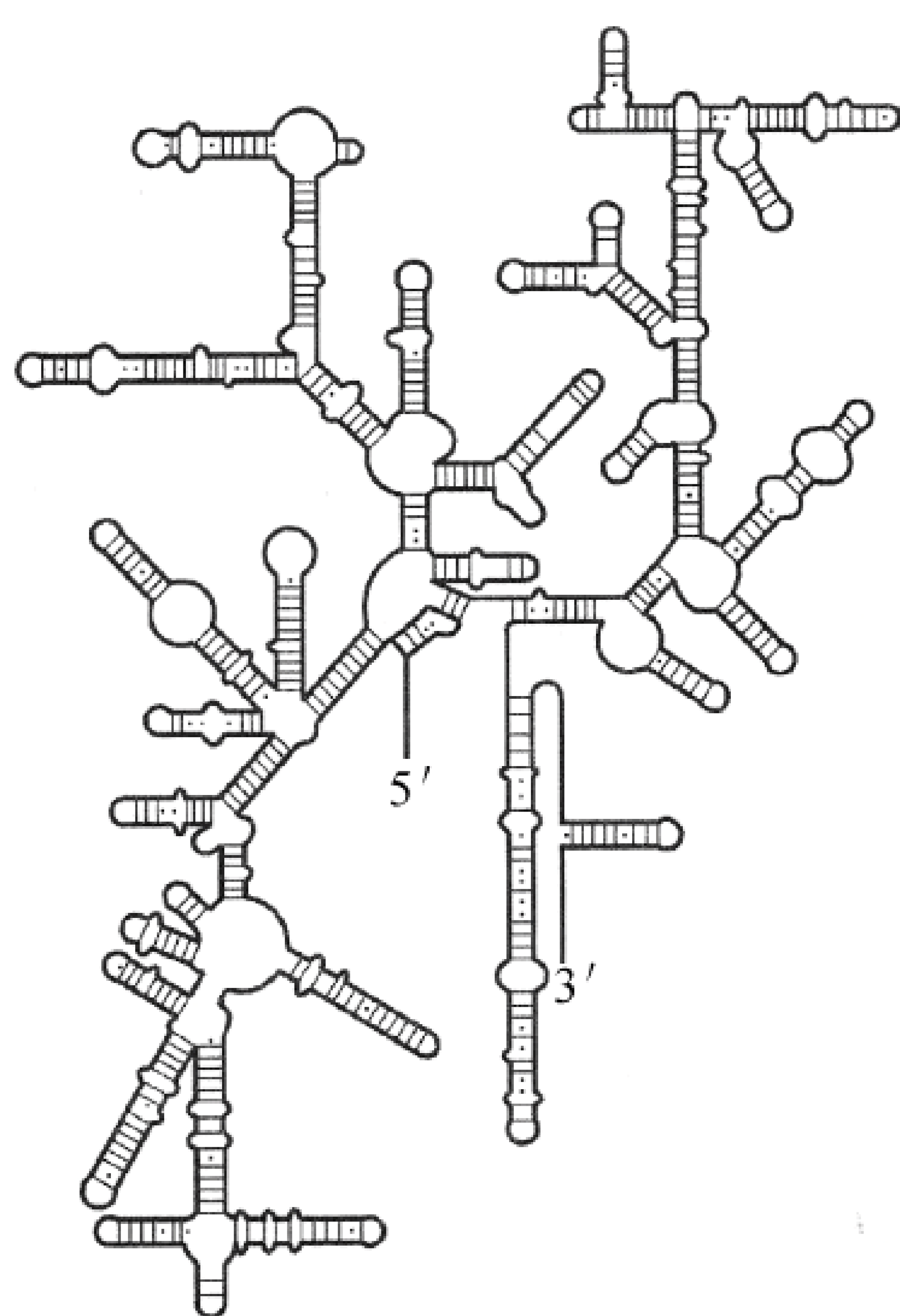


图 11.6 *E. coli* 16S rRNA 的二级结构

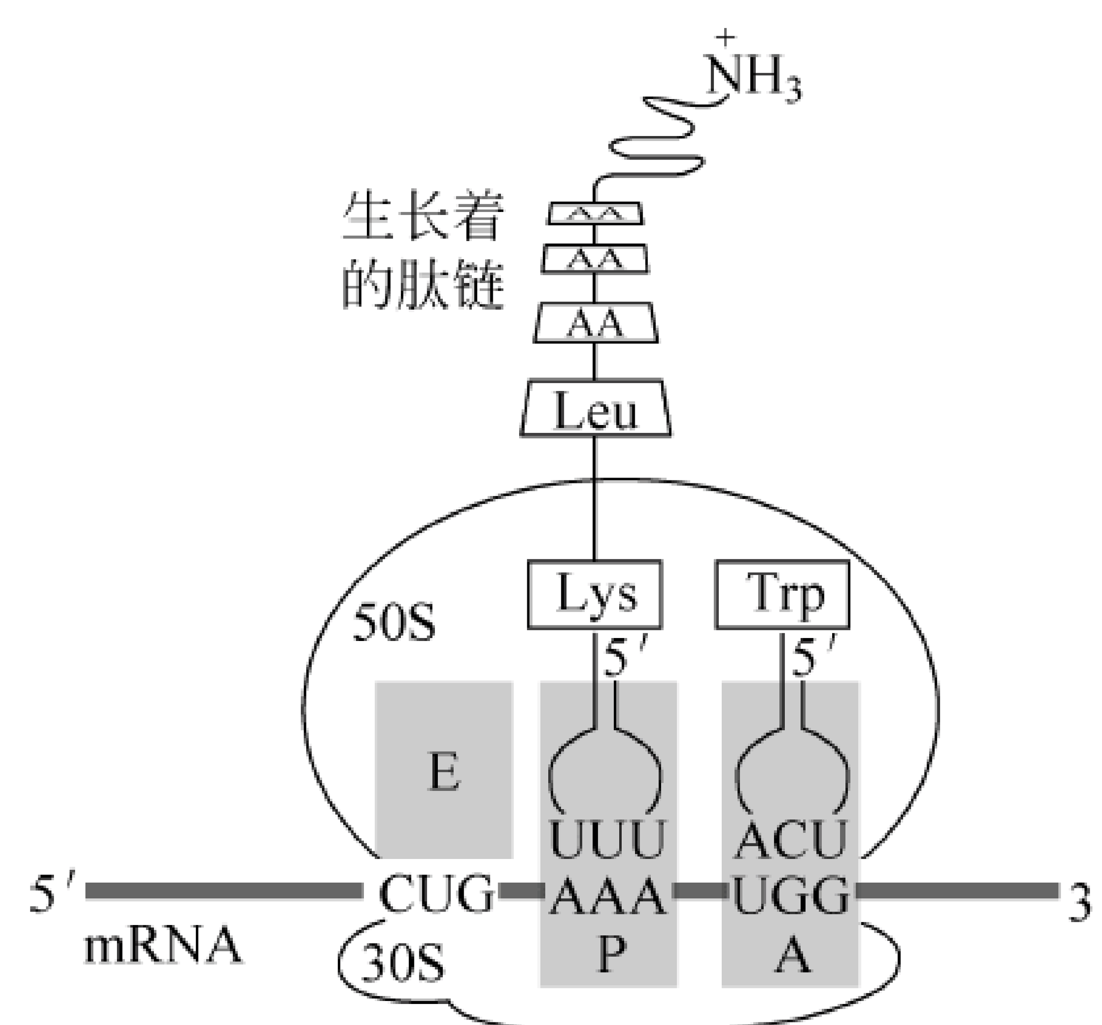


图 11.7 核糖体中结合两个 tRNA 的部位

11.5 原核生物的翻译

像 DNA 复制和 RNA 合成一样，原核生物和真核生物中翻译过程还是有很多差别的，原核生物中的翻译过程研究得更为深入和详细。以下以 *E. coli* 为例，介绍蛋白质合成的具体过程，也像复制和转录那样，将翻译过程分为起始、延伸和终止 3 个阶段进行描述。

11.5.1 起始

蛋白质合成的起始涉及将起始复合物正确组装在一个 mRNA 编码序列的起始处。这个复合物由两个核糖体亚基、模板 mRNA、一个起始 tRNA 和数个称为起始因子的辅助蛋白质组成。这一至关重要的起始步骤确保在翻译开始之前选择合适的起始密码子，确定正确读框。

1. 起始 tRNA

在遗传密码一节中提到被翻译的第一个密码子通常都是 AUG，因此每个细胞都应当至少含有两种类型能够识别 AUG 密码子的 Met-tRNA^{Met}分子。一种类型专门用于起始密码子，称为起始 tRNA，另一类型只识别内部 Met 密码子。尽管这两个 tRNA^{Met}分子具有不同的一级结构和不同的功能，但它们都是通过同样的 Met-tRNA 合成酶氨酰化的。

在 *E. coli* 中起始 tRNA 为 tRNA$_f^{Met}$，结合了 Met 的起始 tRNA 称为 Met-tRNA$_f^{Met}$，经甲酰转移酶催化，将来自 N^{10}-甲酰-THF（四氢叶酸）的甲酰基加到 Met-tRNA$_f^{Met}$ 中 Met 的氨基上，生成 *N*-甲酰-Met-tRNA$_f^{Met}$（fMet-tRNA$_f^{Met}$）（图 11.8）。虽然真核生物中蛋白质合成开始的氨基酸也是 Met，但它并没有被甲酰化。

N-甲酰-Met（细菌）或 Met（其他生物）是整合到蛋白质中的第一个氨基酸，蛋白质合成完成后，*N*-甲酰-Met-可能去甲酰化，或者整个从多肽链除去。

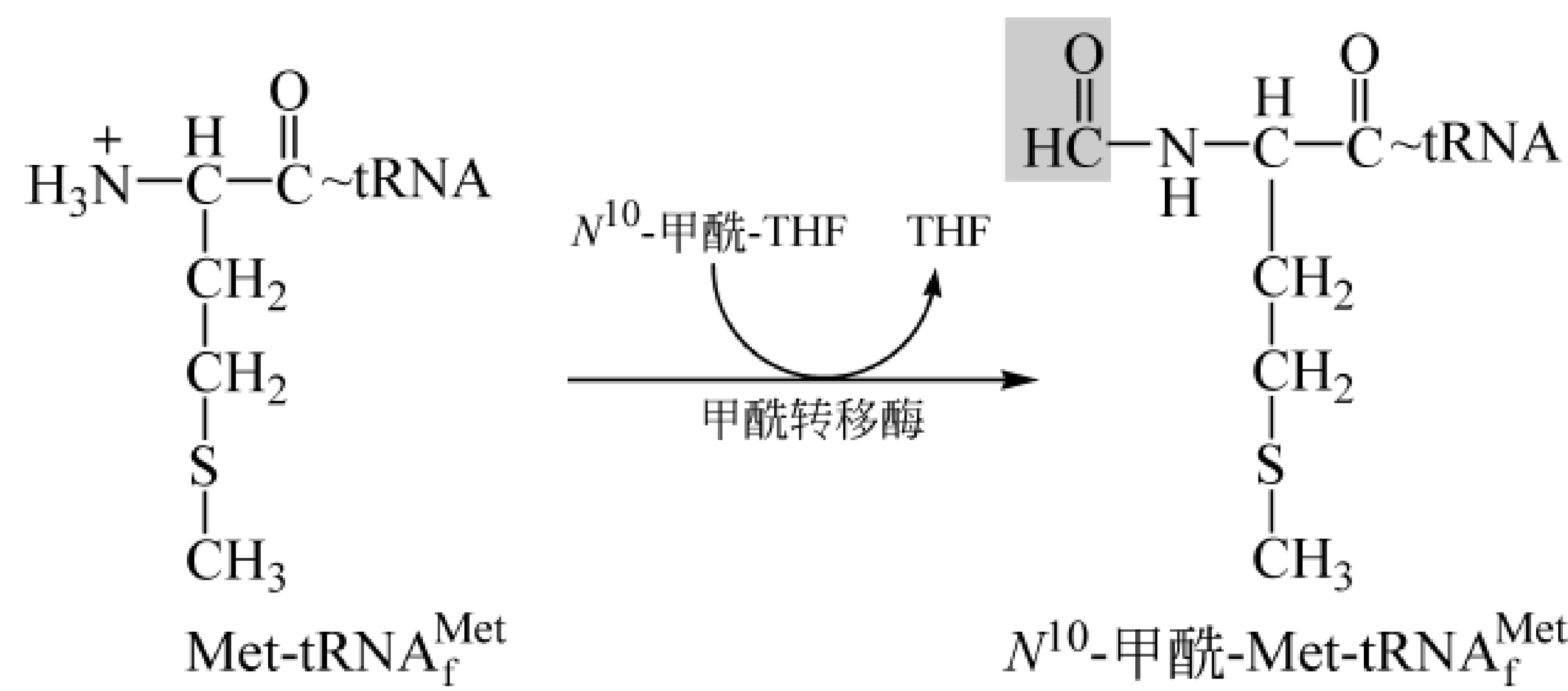


图 11.8　甲酰转移酶反应

阴影部分为甲酰基。Met-$tRNA_f^{Met}$ 是甲酰转移酶的特异底物，而 Met-$tRNA^{Met}$ 不是该酶底物。

2. 起始复合物的组装

在一个 mRNA 分子中存在着 3 种读框，但只有一种是正确的。因此，在翻译起始阶段，确立正确的读框对于将来自 mRNA 的信息精确地破译为蛋白质至关重要。读框即使只漂移一个核苷酸都会改变整个多肽的序列，导致一个非功能蛋白质的合成。所以，翻译机器应当准确定位在作为蛋白质合成起始位点的起始密码子处。核糖体需要区分惟一正确的起始密码子和其他不正确的 AUG，因为起始密码子不一定就是相应的 mRNA 的头 3 个核苷酸，它可能位于 mRNA 5′端的下游。

在原核生物中，起始密码子的选择取决于核糖体的小亚基与 mRNA 模板之间的相互作用。30S 亚基与处于紧靠正确起始密码子上游的富含嘌呤的 mRNA 模板结合，这个区称为 SD 序列(Shine-Dalgarno sequence)，它与 16S rRNA 3′端的一个富含嘧啶区互补。在起始复合物形成过程中，这些互补的核苷酸配对形成可使 mRNA 与核糖体结合的双链 RNA 结构，结果将起始密码子定位在核糖体的 P 位(图 11.9)。

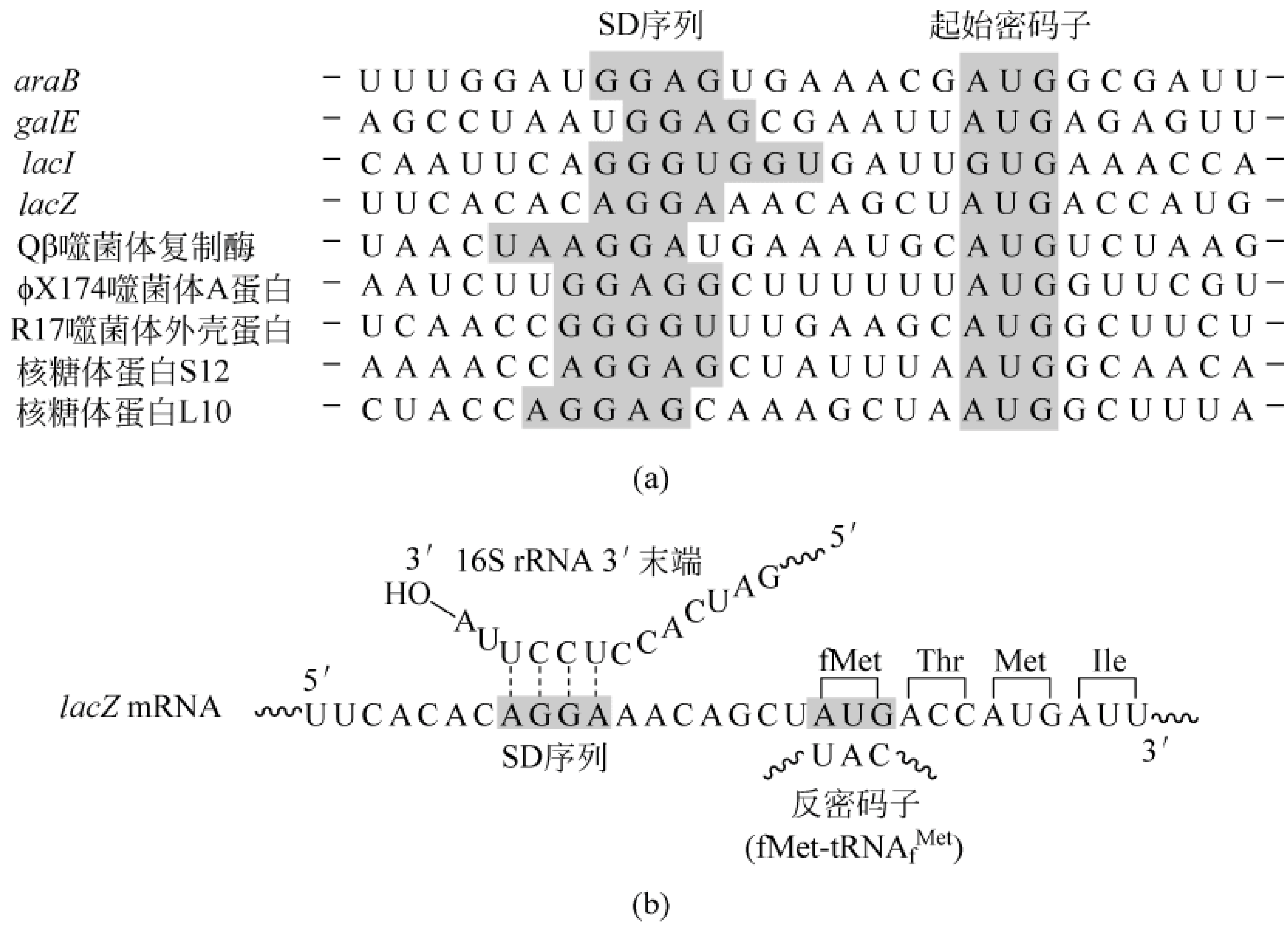


图 11.9　*E. coli* mRNA 中 SD 序列

(a) 用于编码 *E. coli* 几种蛋白质的 mRNA 5′端处结合核糖体的 SD 部位；(b) 16S rRNA 的 3′端与 *lacZ* mRNA 的 SD 序列互补，确立正确读框

起始复合物的形成除了核糖体、起始 tRNA 和 mRNA 之外，还需要几个起始因子。原核生物含有 3 个起始因子(initiation factor，IF)：IF-1，IF-2 和 IF-3，而真核生物至少含有 8 个起始因子。无论是在原核生物，还是在真核生物中起始因子都是催化起始复合物组装在起始密码子处。

IF-3 的一个作用是通过与 30S 亚基结合使核糖体亚基维持在解离状态，阻止 30S 和 50S 亚基提前形成 70S 复合物。另外，IF-3 还帮助将 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 和起始密码子定位在核糖体的 P 位。IF-2 与 GTP 形成 IF-2-GTP 复合物，该复合物能够特异识别起始 tRNA。IF-1 与 30S 亚基结合，促进 IF-2 和 IF-3 的作用。

一旦 30S 复合物在起始密码子处形成，50S 核糖体亚基就与 30S 亚基结合。然后结合在 IF-2 上的 GTP 水解，释放出 P_i，同时起始因子从复合物上解离。当结合在 IF-2 上的 GDP 与 GTP 交换后，重新形成 IF-2-GTP。图 11.10 给出了 70S 起始复合物的形成过程。

11.5.2　延伸

当起始复合物形成，fMet-$tRNA_f^{Met}$ 占据 P 位后，A 位准备接收第二个氨酰-tRNA 时，肽链的延伸就开始了。延伸反应需要一些称为延伸因子(elongation factor，EF)的非核糖体蛋白参与。每连接一个氨基酸都要重复以下由 3 个反应组成的延伸反应循环(图 11.11)。

1. 氨酰-tRNA 的定位

延伸反应循环的第一个反应是将正确的氨酰-tRNA(图 11.11 中的 Pro-$tRNA^{Pro}$)定位在空着的核糖体的 A 位中，这步反应是被称为延伸因子 EF-Tu (temperature-unstable elongation factor)催化的，EF-Tu 是含有 GTP 结合部位的单链蛋白质。首先 EF-Tu 结合 GTP 形成二元复合物 EF-Tu-GTP，然后，该复合物与氨酰-tRNA 结合形成三元复合物，该三元复合物的三级结构适合核糖体的 A 位形状。EF-Tu-GTP 能与除了 fMet-$tRNA_f^{Met}$之外的所有氨酰-tRNA 紧密结合，所以在肽链延伸时，起始的 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 是不会被送到 A 位的。

当使正确的氨酰-tRNA 定位在核糖体的 A 位后，结合的 GTP 水解为 GDP 和 P_i，导致 EF-Tu-GDP 游离出来，在另一个延伸因子 EF-Ts(temperature-stable elongation factor)催化下，GTP 取代 GDP 重新生成 EF-Tu-GTP，以便能够结合下一个氨酰-tRNA 分子。

2. 转肽酰基

当氨酰-tRNA 定位(图 11.11 中的 Pro-$tRNA^{Pro}$)在 A 位后，位于 P 位 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 上的 *N*-甲酰蛋氨酰基转移到 A 位 Pro-$tRNA^{Pro}$ 3′端连接的 Pro 的 α-氨基上，在 A 位形成了 N 端为 *N*-甲酰蛋氨残基的二肽酰-tRNA，而脱去了 *N*-甲酰蛋氨酰基的 $tRNA_f^{Met}$ 仍留在 P 位。这实际上是 α-氨基作为亲核试剂置换 P 位 tRNA 生成了一个肽键(图 11.12)。

在第一个肽键生成时，转移的是 *N*-甲酰蛋氨酰基，但延伸第 2 个氨基酸之后的反应都是转肽酰基反应。这个转肽反应不需要像 ATP 那样的高能化合物，因为肽酰-tRNA 之间的酯键本身就是一个高能键。到目前为止的研究表明催化这一反应的可能是由核糖体中某些蛋白和 23S rRNA 组成的所谓的肽酰转移酶，其中 23S rRNA 可能具有核酶那样的活性。

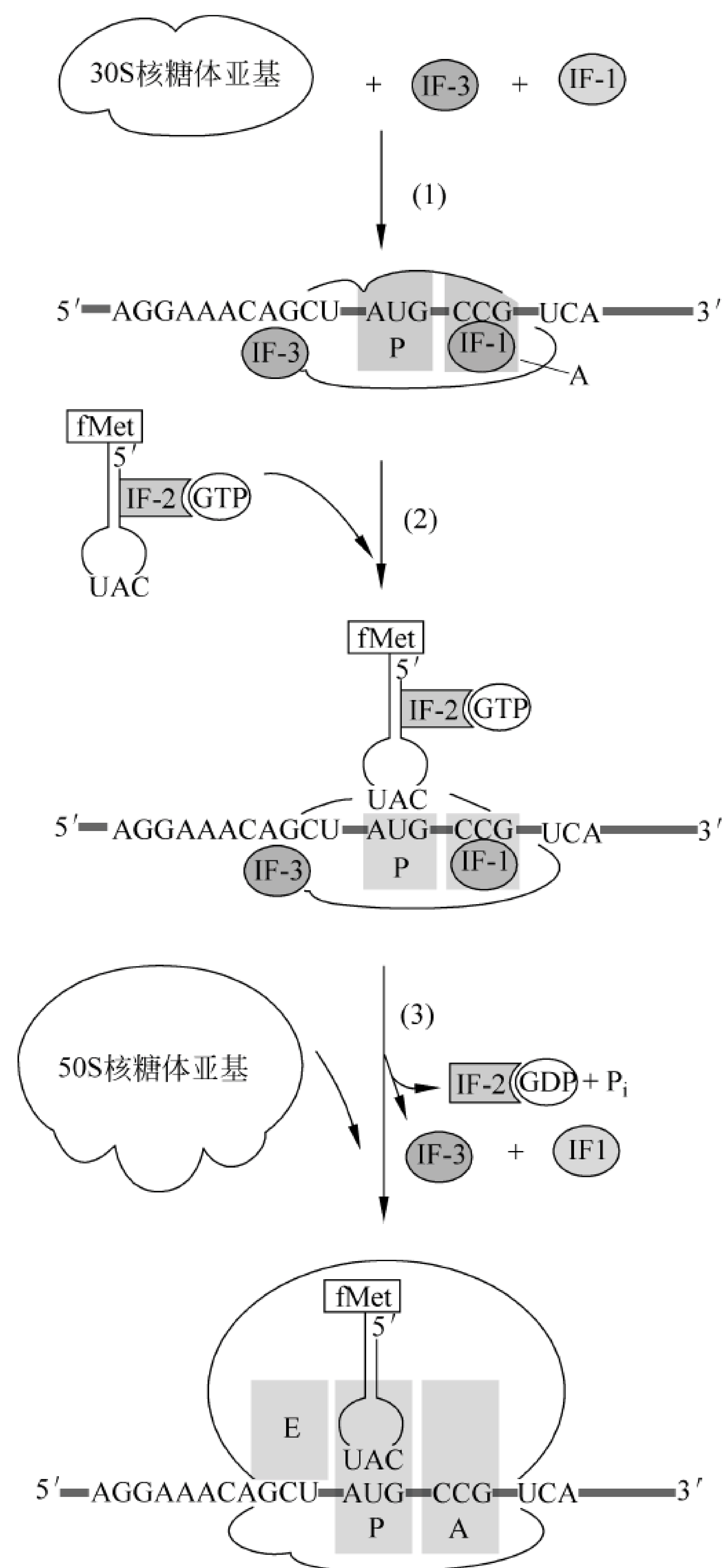


图 11.10　原核生物 70S 起始复合物的形成

(1) IF-3 和 IF-1 结合 30S 亚基防止 70S 复合物预先形成；(2) IF-2-GTP 与 30S 亚基结合，促进 fMet-$tRNA_i^{Met}$的结合，30S 复合物通过识别 SD 序列和起始密码子与 mRNA 结合；(3) 50S 亚基与 30S 起始复合物结合释放出 IF-1 和 IF-3，结合在 IF-2 上的 GTP 水解为 GDP 和 P_i，游离出 IF-2-GDP，留下带有定位于 P 位的起始 fMet-$tRNA_i^{Met}$的 70S 起始复合物

3. 移位

在肽键形成之后，核糖体向 mRNA 的 3′端移动一个密码子的距离(图 11.11 中移动到 UCA)，移动导致仍与 mRNA 结合的新合成的二肽酰-tRNA 从 A 位移位至 P 位，结果 A 位被空了出来，又可接收下一个氨酰-tRNA。原来位于 P 位的脱去氨酰基的 tRNA 进入 E 位，然后脱离核糖体进入胞质。

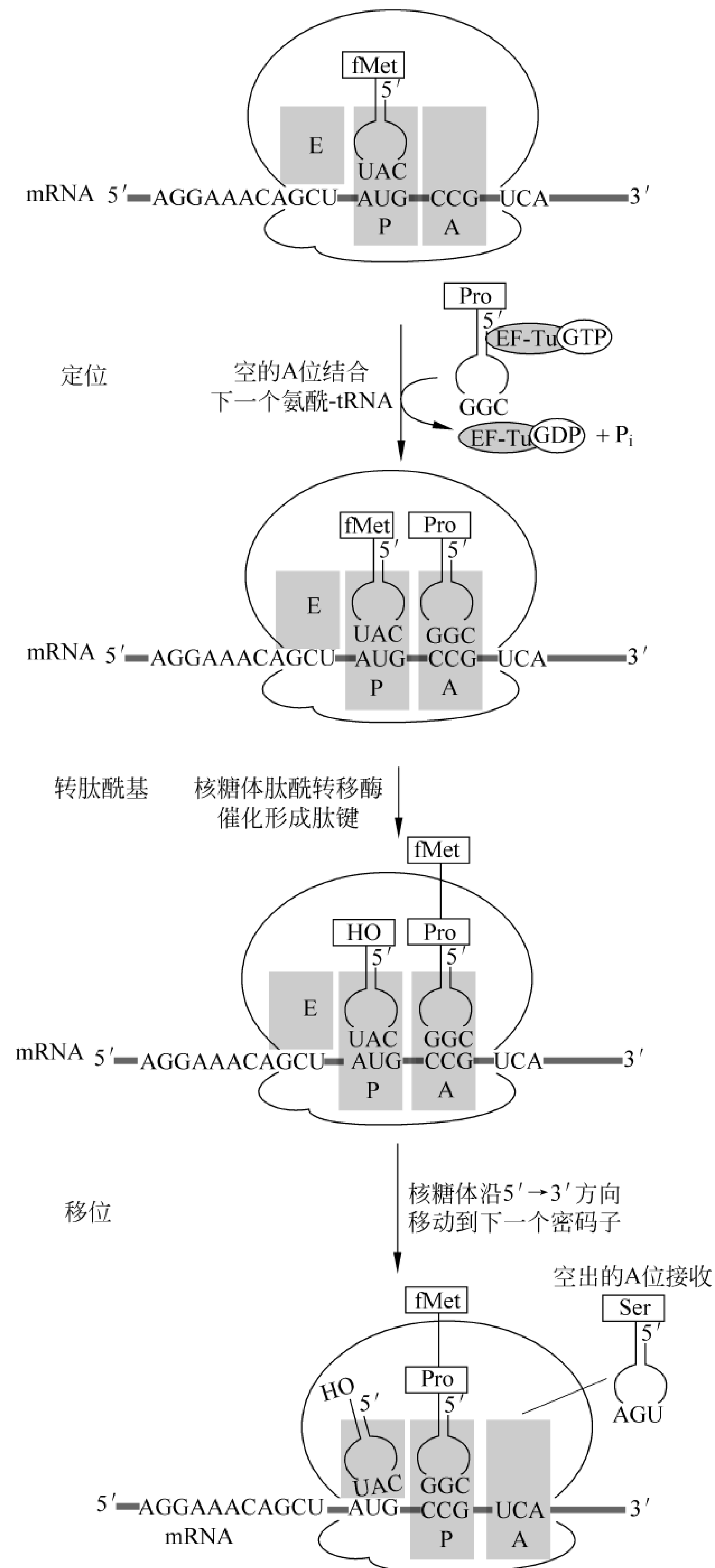

fMet
5′
E
UAC
mRNA 5′ AGGAAACAGCU AUG CCG UCA 3′
P
A
Pro
5′
EF-Tu GTP
定位
空的A位结合
下一个氨酰-tRNA
GGC
EF-Tu GDP + Pi
fMet
Pro
5′
5′
E
UAC
GGC
mRNA 5′ AGGAAACAGCU AUG CCG UCA 3′
P
A
转肽酰基
核糖体肽酰转移酶
催化形成肽键
fMet
HO
Pro
5′
5′
E
UAC
GGC
mRNA 5′ AGGAAACAGCU AUG CCG UCA 3′
P
A
移位
核糖体沿5′→3′方向
移动到下一个密码子
空出的A位接收
fMet
Ser
5′
Pro
HO
5′
5′
AGU
UAC
GGC
5′ AGGAAACAGCU AUG CCG UCA 3′
mRNA
P
A

图 11.11 肽链延伸

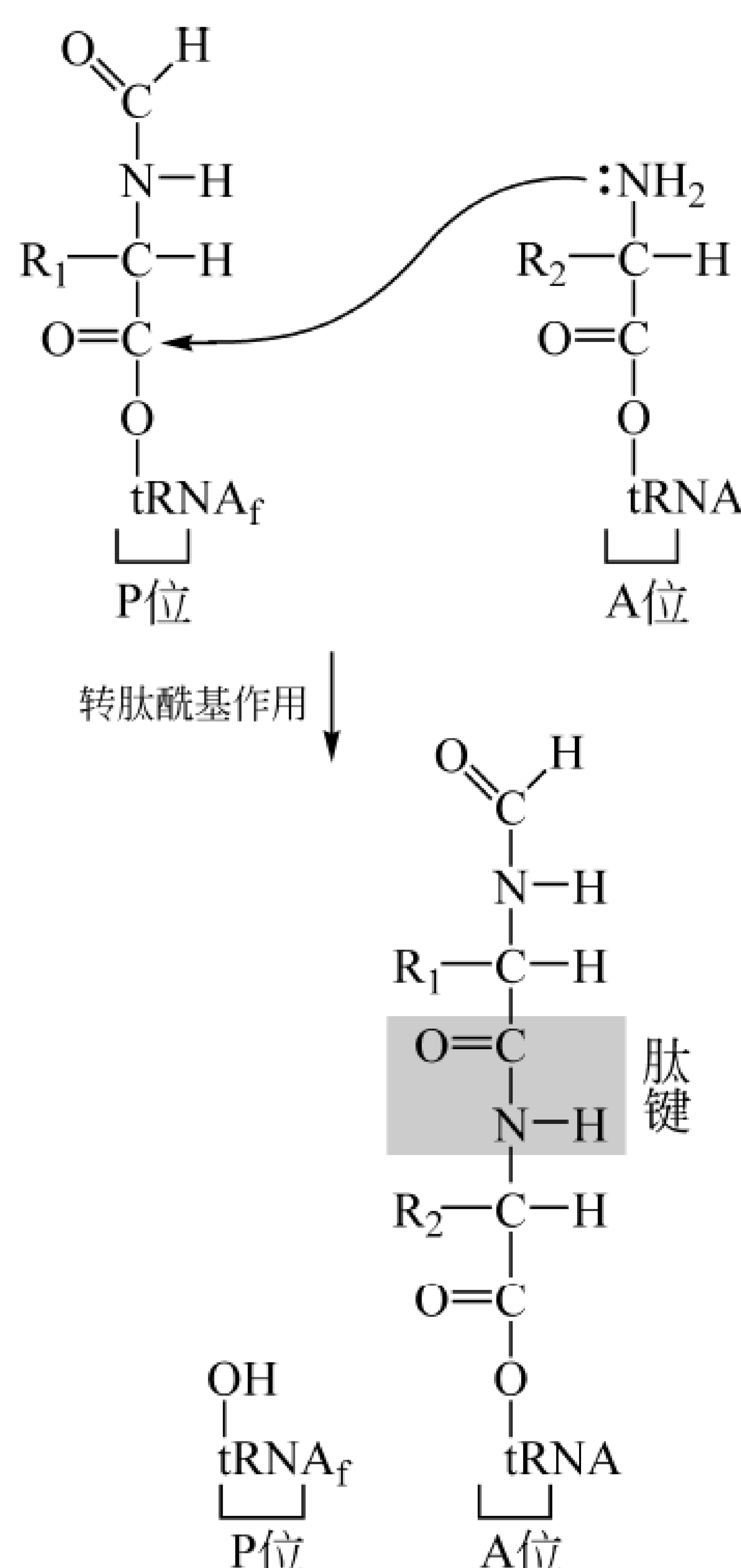


图 11.12 通过氨酰基转移反应形成肽键(阴影部分)

R_1 为 N-甲酰蛋氨酸基侧链;R_2 为 Pro 的侧链

核糖体移位需要另一个延伸因子 EF-G(也称为移位酶)参与,与 EF-G 结合的 GTP 水解释放能量提供移位所需要的能量。每重复一次延伸循环反应,伴随着消耗两个 GTP,多肽链上就增加一个氨基酸。

11.5.3 终止

E. coli 有 3 个参与蛋白质合成终止的释放因子(release factor: RF):RF-1、RF-2 和 RF-3。在最后一个肽键形成后,通常肽酰-tRNA 由 A 位转移至 P 位,移位使一个终止密码子(UAA,UAG 或 UGA)处于 A 位。这些终止密码子不能被任何 tRNA 分子识别,因此蛋白质合成就停止在终止密码子处。最终一个释放因子扩散入 A 位,RF-1 识别 UAA 和 UAG, RF-2 识别 UAA 和 UGA,而结合了 GTP 的 RF-3 可促进 RF-1 或 RF-2 与核糖体的结合。当释放因子识别一个终止密码子时,引起肽酰-tRNA 水解。伴随着 GTP 的水解,释放出一个合成的多肽链,那些释放因子也都从核糖体上解离下来。同时核糖体亚基也与 mRNA 分离,起始因子与 30S 亚基结合为下一轮蛋白质合成做准备(图 11.13)。

蛋白质合成是个耗能的过程,生成氨酰-tRNA 时虽说是消耗了一个 ATP,但实际上是两个高能磷酸酯键水解,移位和延伸时又各消耗了一个 GTP,所以每形成一个肽键都需要 4 个高能磷酸酯键的水解。

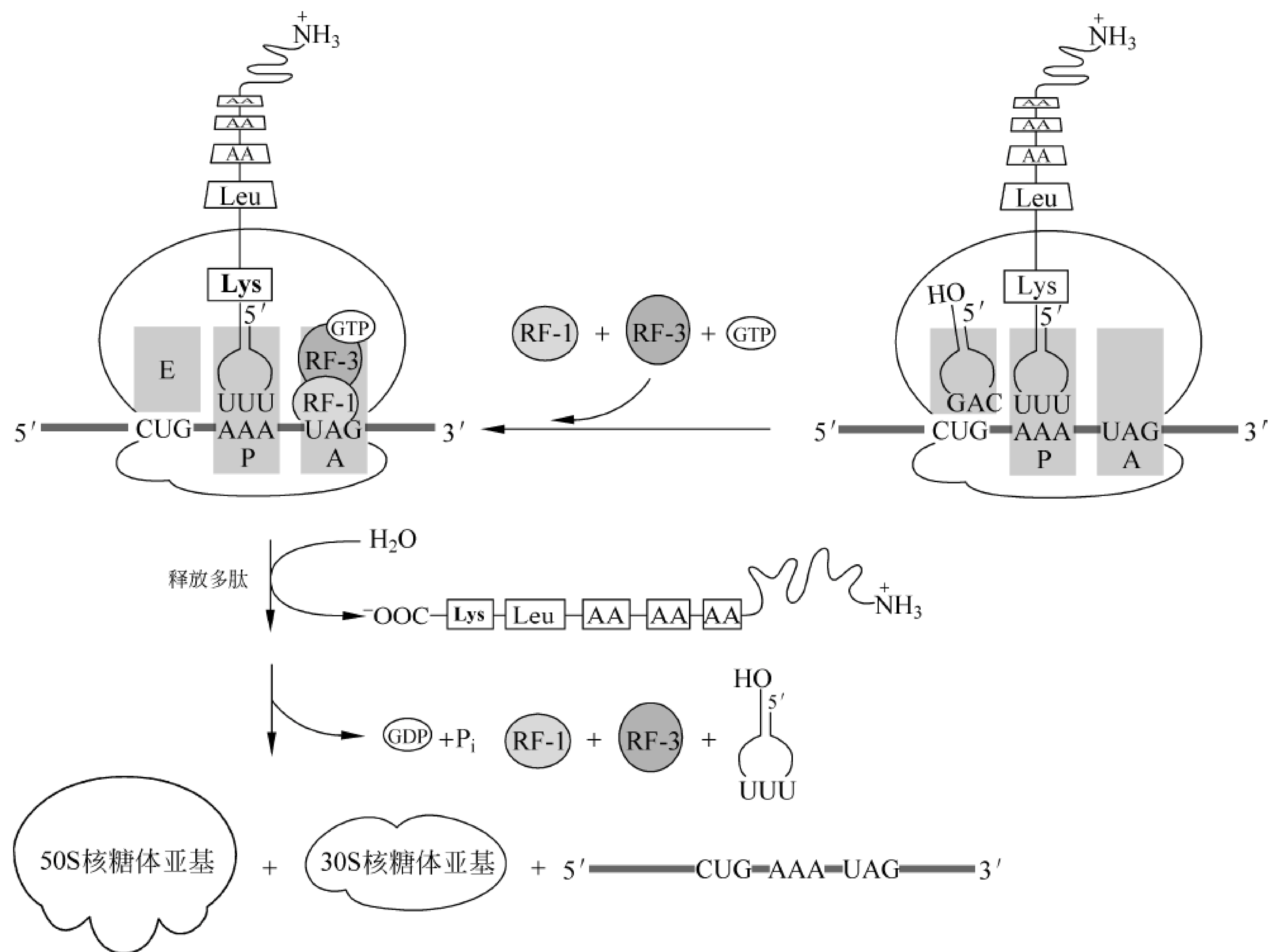
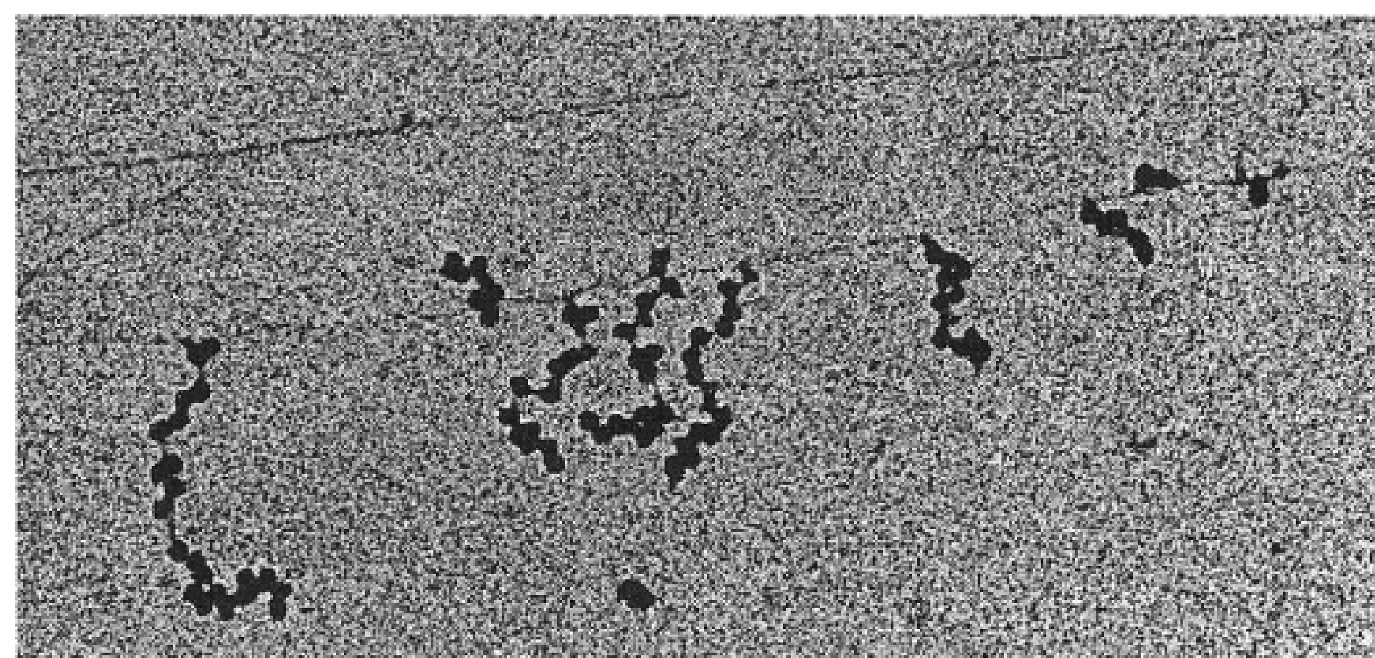


图 11.13　*E. coli* 中翻译终止

11.5.4　多核糖体

在细菌内，当mRNA在合成时，核糖体就结合在mRNA上，从5′端开始翻译，转录和翻译是偶联在一起的，而且核糖体会一个接一个地结合到mRNA上(图11.14)。一条mRNA链串联着许多核糖体，这样的核糖体群被称为多聚核糖体(polyribosome)或简称为多核糖体(polysome)，每个核糖体都在忙于翻译，从核糖体长出的肽链长短不一，有的翻译已快完成，有的才刚刚开始。



(a)

图 11.14　*E. coli* 基因转录与翻译偶联

(a) *E. coli* 多核糖体电镜照片；(b)为(a)电镜照片的示意图，显示RNA聚合酶正由右向左转录DNA，同时多核糖体结合在转录出的mRNA上进行翻译；(c)结合在同一条mRNA的多核糖体同时进行蛋白质合成的示意图，每个核糖体都是由左向右进行翻译

(来源：Gerald Karp，2009)

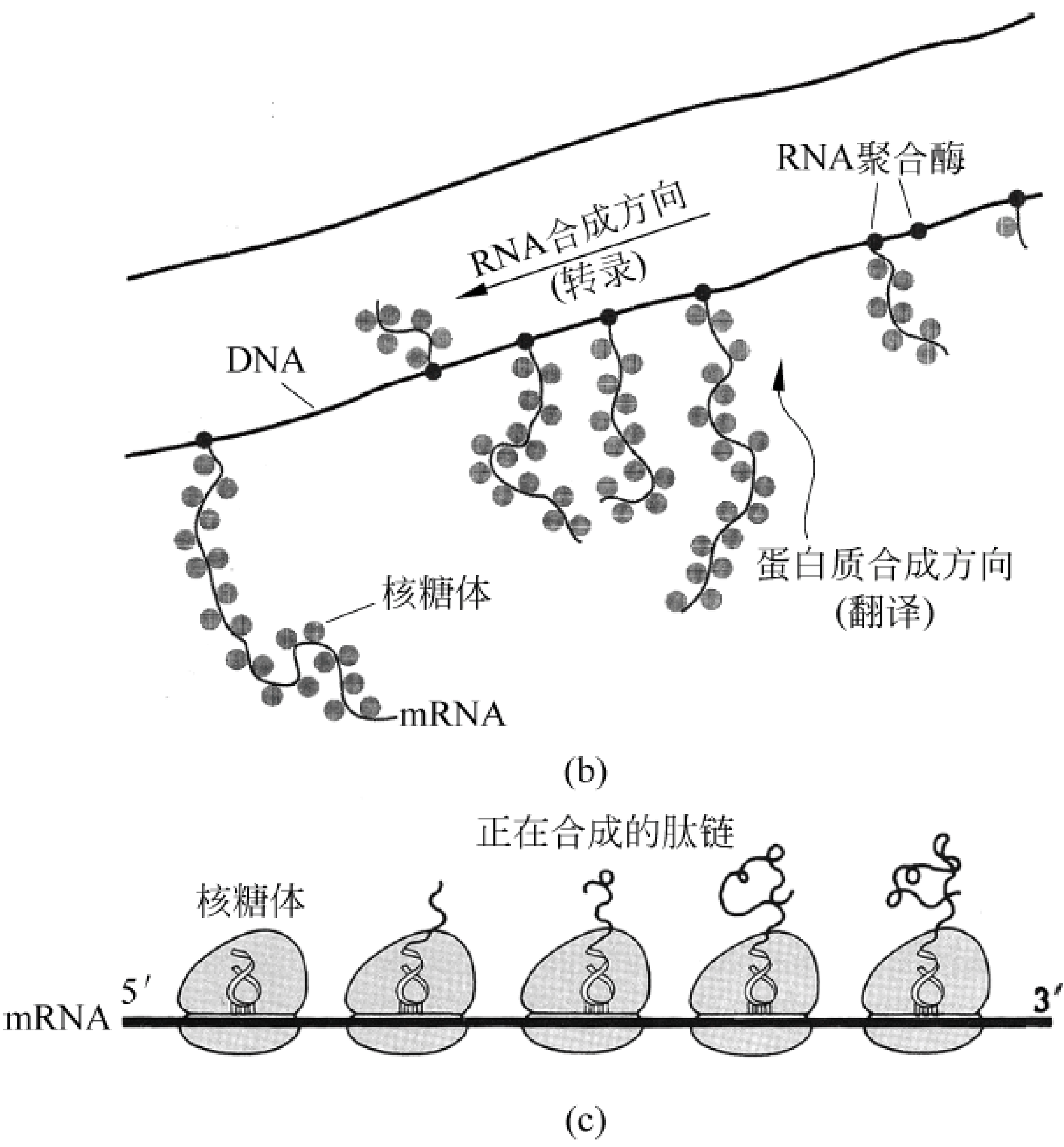


图 11.14(续)

在真核生物中,mRNA 是在细胞核中合成后经 5′末端带 7-甲基 GTP 帽和 3′末端加 poly(A)尾巴以及剪接,被转运到细胞质后,与游离的核糖体,或与内质网相连的核糖体结合后才开始蛋白质合成的。所以真核生物中不存在原核生物那样的转录与翻译偶联现象,但真核生物中也存在多核糖体同时结合在一条成熟的 mRNA 上进行翻译的情况。

11.6 真核生物的翻译

真核生物翻译的主要特征类似于原核生物,但需要大量的非核糖体蛋白因子,而且过程更复杂些。真核生物核糖体也是由两个亚基组成的,一个完整的脊椎动物的 80S 核糖体由 40S 和 60S 两个亚基组成。40S 的小亚基含有约 30 种蛋白质和一分子的 18S rRNA。60S 的大亚基含有约 40 种蛋白质和 3 个 rRNA 分子(5S rRNA,28S rRNA 和 5.8S rRNA)。

另外真核生物的成熟 mRNA 结构上具有两个显著特征:5′端有个"帽"结构,3′端有一个 poly(A)尾(图 11.15)。研究表明这两个结构特征都是翻译所必需的,7-甲基 GTP 帽是真核生物结合 mRNA 所必需的,同时还有防止被 5′核酸外切酶降解而稳定 mRNA 的作用。

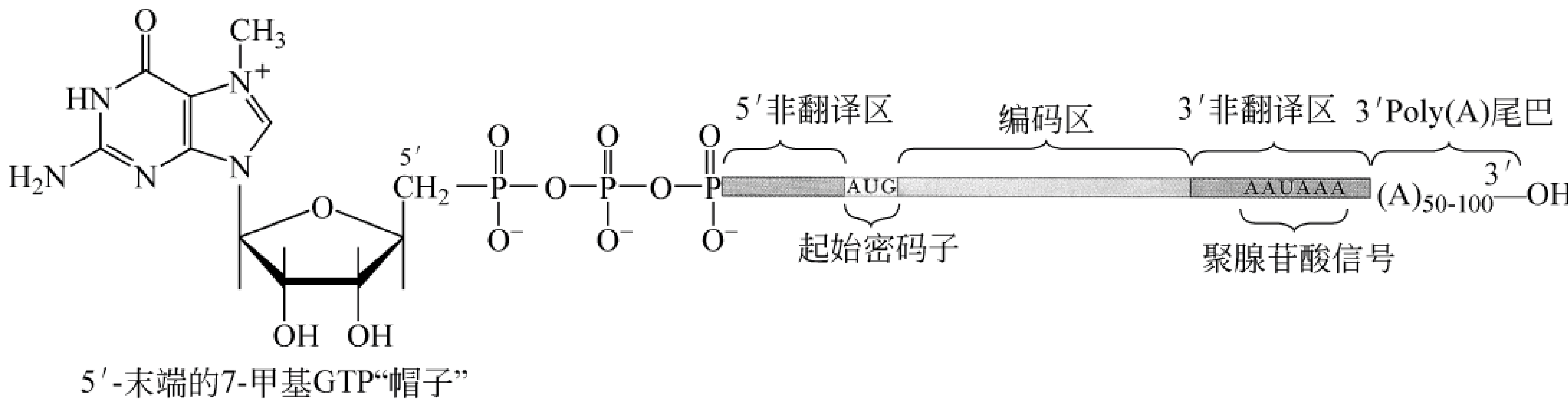


图 11.15 真核生物成熟 mRNA 的结构

poly(A)尾具有增强真核生物 mRNA 稳定性和翻译效率两方面的作用。另外还发现在真核生物 mRNA 中缺少像原核生物 mRNA 5′端那样的 SD 序列。

11.6.1　起始

真核生物肽链合成起始过程类似于原核生物，但有更多的真核生物起始因子(eukaryotic initiation factors，eIFs)参与，其中许多都是多亚基的蛋白质。表 11.4 给出了这些起始因子的相关信息。

表 11.4　真核生物翻译起始因子

起始因子	亚基	大小(kD)	功　　能
eIF-1		15	增强起始复合物形成
eIF-1A		17	稳定 Met-tRNA，与 40S 核糖体结合
eIF-2		125	与 GTP 和 Met-tRNA 形成复合物，与 40S 核糖体结合
	α	36	磷酸化调控
	β	50	结合 Met-tRNA
	γ	55	结合 GTP，Met-tRNA
eIF-2B		270	促进 eIF-2 上 GTP 的交换
eIF-2C		94	稳定 RNA 存在下的三元复合物
eIF-3		550	促进 Met-tRNA 与 mRNA 结合
eIF-4F		243	由 eIF-4A、eIF-4E 和 eIF-4G 组成
eIF-4A		46	结合 RNA；ATP 酶；RNA 解旋酶；促进 mRNA 与 40S 核糖体结合
eIF-4E		24	结合 mRNA 帽
eIF-4G		173	结合 eIF-4A，eIF-4E，eIF-3 和 Pablp
eIF-4B		80	结合 mRNA；促进 RNA 解旋酶活性和 mRNA 与 40S 核糖体结合
eIF-5		49	促进 eIF-2 的 GTP 酶活性以及 eIF-2 和 eIF-3 释放
eIF-5B		175	核糖体依赖性 GTP 酶活性；参与 40S 和 60S 的结合
eIF-6			使 80S 解离；结合 60S

(来源：Clark B F C，et al.，1996)

图 11.16 给出了真核生物肽链起始的 3 个主要步骤。

(1) 形成 43S 前起始复合物。首先 eIF-2 和 GTP 以及起始氨酰-tRNA 形成三元复合物。要注意的是，起始氨酰-tRNA 不是 $\text{fMet-tRNA}_i^{\text{Met}}$，而是 $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$(式中的 i 表示起始 tRNA^{Met})，即蛋氨酸没有被甲酰化。然后该复合物与已结合了 eIF-1A 和 eIF-3 的核糖体 40S 亚基结合，组装成 43S 前起始复合物。与原核生物肽链起始不同，在这一步中结合第一个氨酰-tRNA($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$)时，并没有 mRNA 存在。

(2) 募集 mRNA。首先 43S 前起始复合物与 mRNA 的结合，然后将核糖体正确定位于 AUG。在真核生物中起始密码子前没有 SD 序列，而是由 5′帽子通过 ATP 水解驱动的所谓扫描机制(scanning mechanism)将核糖体正确定位于 AUG。

43S 前起始复合物结合 mRNA 需要一套称为 eIF-4 族的蛋白质协助，这些蛋白质识别 mRNA 的 5′帽和 3′poly(A)尾，以及未解旋的任何 mRNA 的二级结构，并将 mRNA 转移到 43S 前起始复合物。eIF-4 族包括 eIF-4B 和 eIF-4F，而 eIF-4F 是一个由 eIF-4A、eIF-4E 和 eIF-4G 组成的三聚体复合物。由于 eIF-4G 可与一个与 poly(A)片段结合的 poly(A)-结合

蛋白[poly(A)-binding protein,Pab1p]作用,所以 eIF-4G 起着结合 5′帽的 eIF-4E、mRNA 的 poly(A)尾和 40S 核糖体亚基(通过与 eIF-3 相互作用)之间的桥梁的作用。5′端 7 甲基 GTP 帽和 3′端 poly(A)尾之间的相互作用启动 40S 核糖体亚基的扫描,搜索 AUG 密码子(图 11.17)。

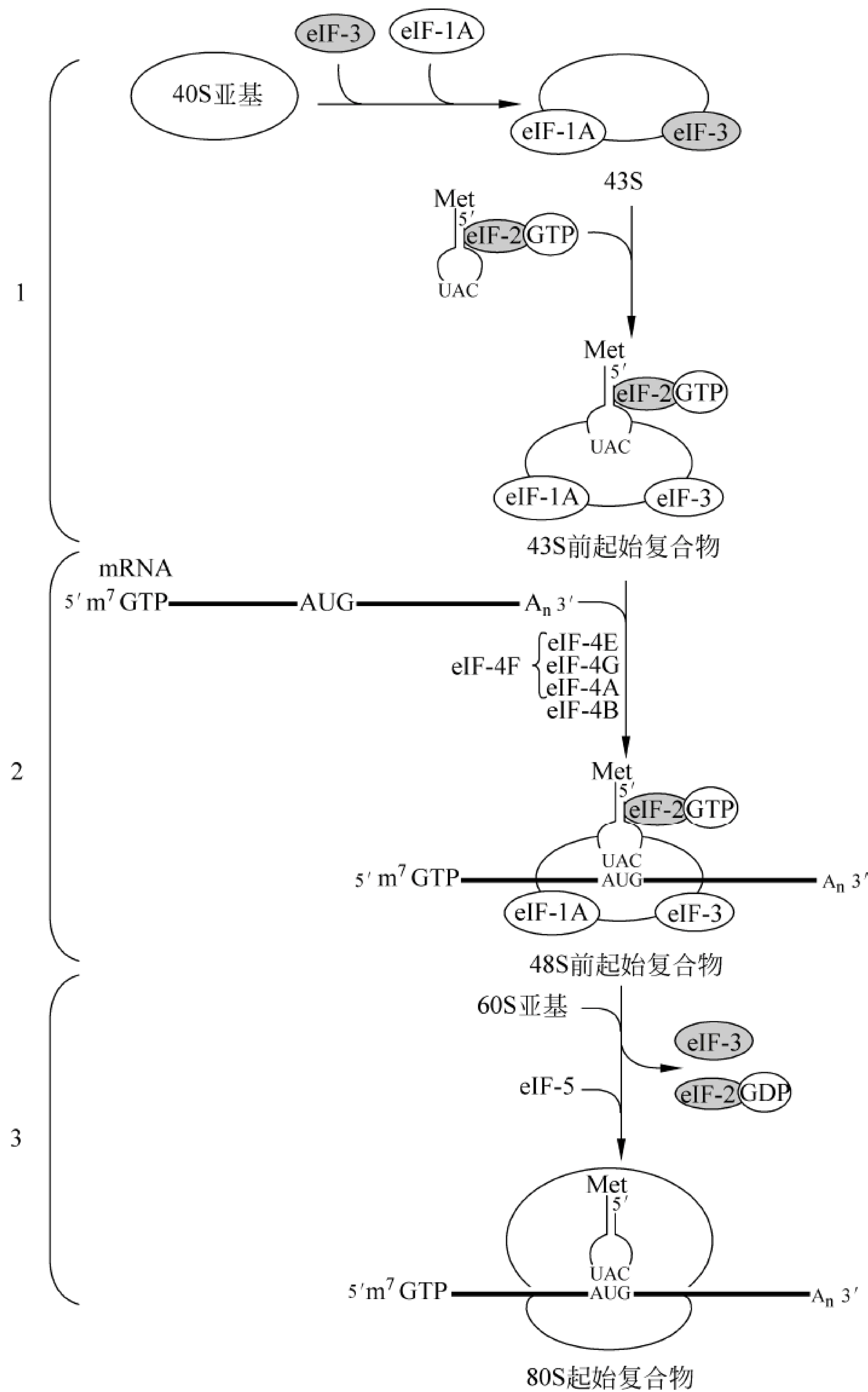


图 11.16 真核生物中翻译起始的 3 个步骤

m^7GTP:7-甲基 GTP

eIF-40S 复合物起初处于起始密码子的上游,然后向 3′方向移动,直至遇到正确序列(correct context)的第 1 个 AUG。所谓正确序列是由起始密码子 AUG 周围几个碱基确定的,称为 Kozak 序列,其特征是一段共有序列$_{-3}$ACCAUGG$_{+4}$。

在第 2 步,由 mRNA 与 43S 前起始复合物形成了一个 48S 前起始复合物。

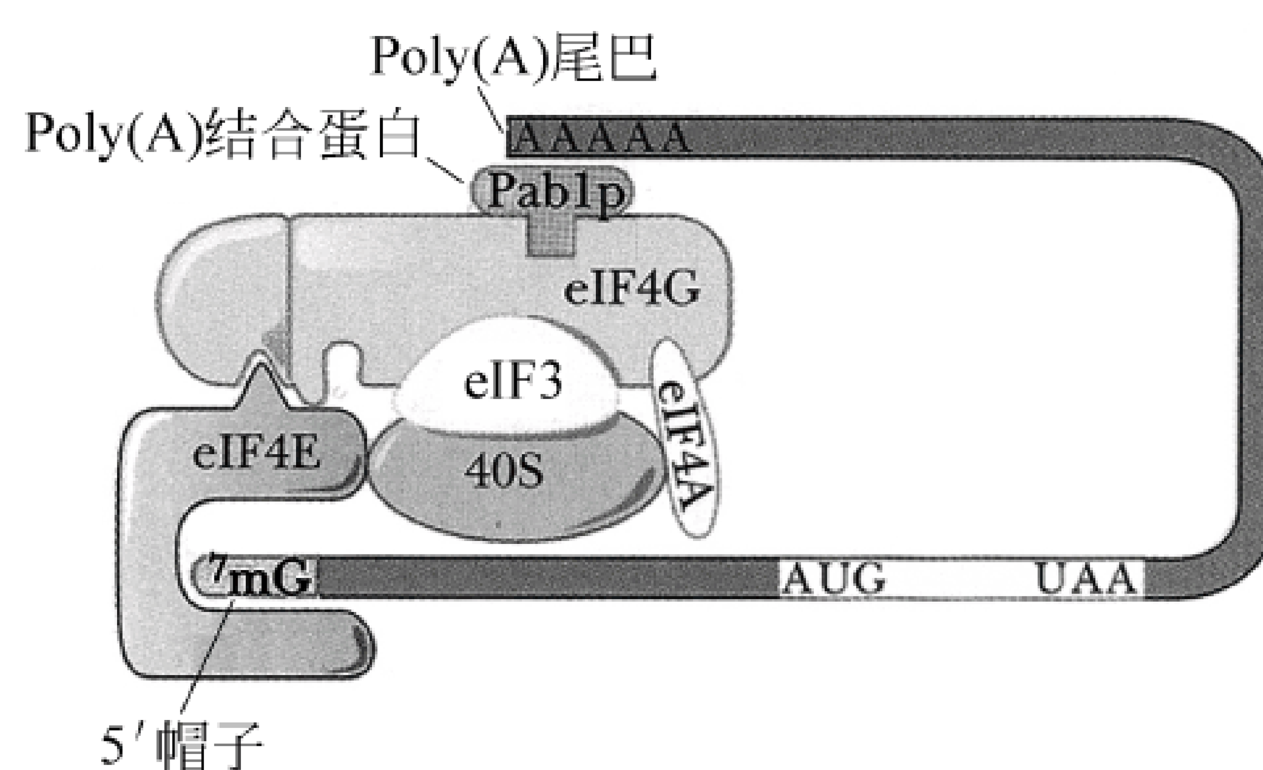


图 11.17 真核生物翻译起始中 mRNA 成环

（来源：heutze H W，1997）

(3) 募集 60S 核糖体。当 48S 前起始复合物停在 AUG 密码子处，eIF-2 和 GTP 以及 Met-tRNA$_i^{Met}$形成的三元复合物中的 GTP 水解，引起起始因子的释放，同时导致 60S 核糖体的结合，形成 80S 起始复合物。

11.6.2 延伸和终止

真核生物的延伸循环非常类似于原核生物，具有同样的肽酰转移和核糖体移位的机制。两者差别是真核生物核糖体中没有 E 位，只有 A 位和 P 位。有 eEF-1 和 eEF-2 两个延伸因子，eEF-1 由 eEF-1A 和 eEF-1B 构成，eEF-1A 和 eEF-1B 的功能分别相当于原核生物中的 EF-Tu 和 EF-Ts 的功能。eEF-2 类似于 EF-G 功能。

真核生物的肽链终止也类似于原核生物，当核糖体移动遇到终止密码子 UAG、UAA 或 UGA 时，也是没有一个 tRNA 分子能够识别。但真核生物中惟一的一个释放因子 RF 就能与所有 3 个终止密码子结合，并催化合成的氨基酸的 C 末端与 tRNA 之间的酯键水解，释放出新合成的多肽链，核糖体与 mRNA 也随之解离。

11.7 新生多肽链的折叠和翻译后加工

脱离开核糖体的新生多肽链还需要经历蛋白质合成的最后一个阶段：折叠和翻译后加工成具有惟一天然构象和生物活性的蛋白质。大多数情况下，当多肽链合成还在进行时，肽链本身折叠和修饰就已经开始了，经折叠确立正确的氢键、离子键、范德华力和疏水相互作用等，使多肽链逐渐形成天然构象。另外，原核生物和真核生物的一些新生蛋白质还要进行翻译后加工，才能最终获得具有生物活性的蛋白质。

11.7.1 新生多肽链的折叠

就像 Christian Anfinsen 指出的那样，每个蛋白质折叠成惟一的三维结构的信息存在于它的氨基酸序列或称为一级结构中。甚至在核糖体被完全合成之前，大部分新生多肽链就开始了自发折叠[图 11.18(a)]，或者是在伴侣蛋白 Hsp70 协助下进行折叠[图 11.18(b)]，或者是在 Hsp70 和陪伴蛋白复合物协助下进行折叠[图 11.18(c)]。

约 85%的蛋白质如图 11.18(a)和图 11.18(b)那样折叠的。其余的 15%蛋白质如图 11.8(c)所示，是在 Hsp70 和陪伴蛋白复合物的协助下完成折叠的。来自 *E. coli* 的陪伴蛋

白复合物为GroES-GroEL复合物。GroEL由上下两个堆积的都带有中腔的60kDa亚基的7元环构成,而GroES是位于GroEL上面,由7个10kDa亚基组成的7元环“盖”[图11.18(d)]。

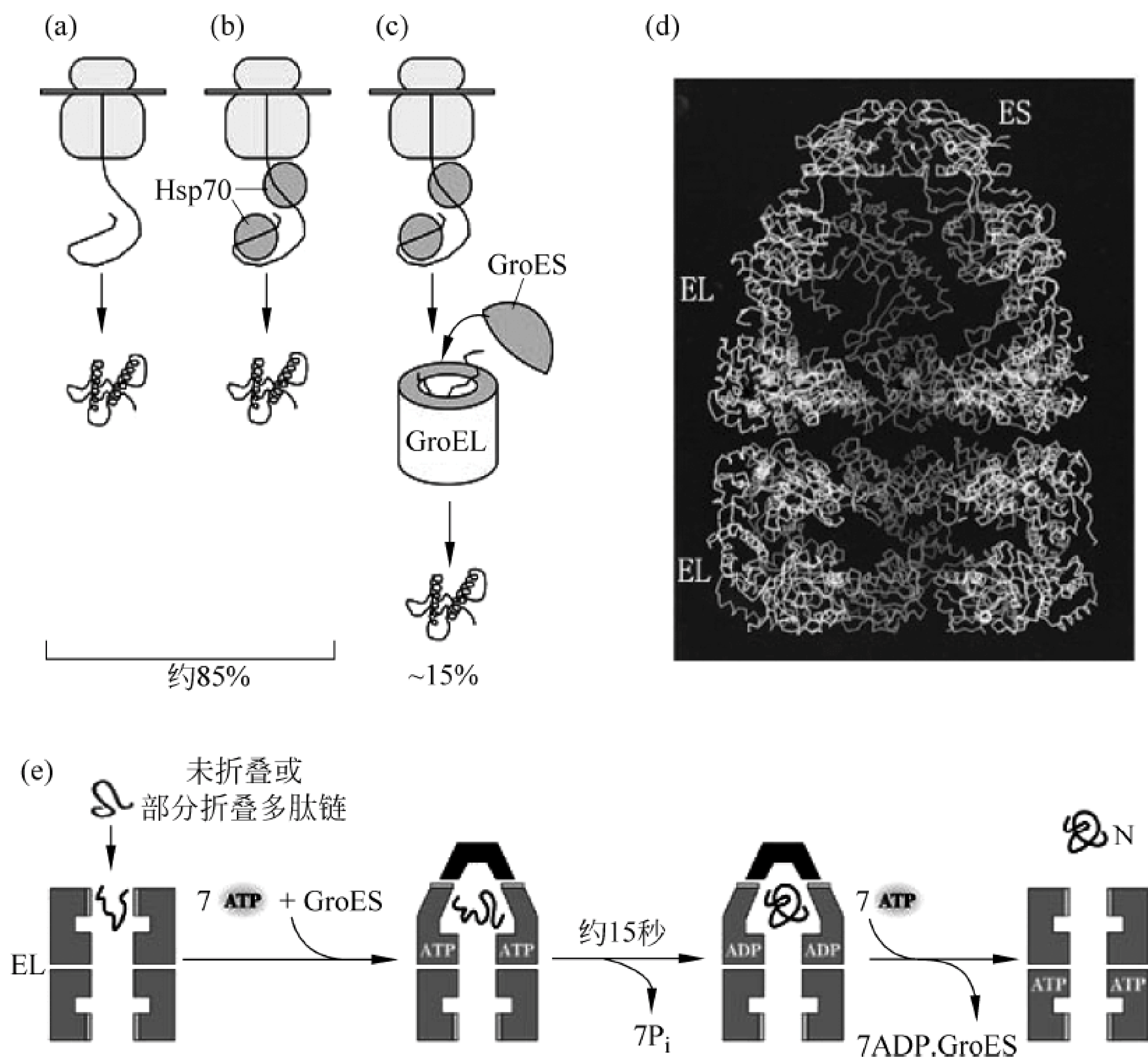


图11.18 新生多肽链的折叠途径

(a) 无伴侣蛋白的折叠,当多肽链于核糖体中刚一合成就开始折叠;(b) Hsp70协助多肽链折叠,Hsp70与新合成多肽链结合,帮助折叠;(c) 多肽链在Hsp70和陪伴蛋白复合物的协助下折叠,*E. coli*中陪伴蛋白复合物为GroES-GroEL;(d) 显示出中心腔的GroES-GroEL复合物结构;(e) GroEL圆筒的作用模式

首先未折叠或部分折叠的多肽与亚基环上部分疏水区结合,接着ATP结合,GroES与上部GroEL结合(盖上盖)。ATP结合击发了构象变化,将多肽释放到中心腔内。约15秒钟后,然后GroES与下部亚基环结合,引起GroEL∶ADP∶GroES解离,失去GroES盖后,已折叠的蛋白质由GroEL进入胞质溶胶[图11.18(e)]。如果折叠没有完成,将重复上述循环,直至获得充分折叠形式。

11.7.2 翻译后加工

当翻译复合物沿着mRNA按照5′→3′方向移动时,新生多肽链长度延伸。刚合成的30个左右已聚合的氨基酸残基还埋于核糖体中,但接近N末端的氨基酸残基已露出核糖体。在蛋白质的C端合成之前,N端残基已开始折叠成天然蛋白质结构,而且在酶的作用下,这些氨基酸在折叠时就被修饰了。

修饰发生在多肽链完成之前被称为共翻译修饰,而发生在合成后被称为翻译后修饰。修饰包括在原核生物中N末端残基的去甲酰化,从原核生物和真核生物蛋白质中除去N末

端蛋氨酸，形成二硫键、蛋白酶切割、磷酸化、附加糖残基和乙酰化等。许多真核细胞蛋白质的翻译后修饰都开始于内质网，研究发现蛋白质转移到内质网还需要信号引导，称为寻靶(targeting)。

大部分溶酶体蛋白、膜蛋白和分泌蛋白质在它们的氨基末端都有一段信号序列，正是这段序列使蛋白质转移至内质网。进入内质网后，随着信号序列被切除后，多肽链进行折叠，形成二硫键，还有许多蛋白质发生糖基化。经过修饰的蛋白质通过转移小泡从内质网被送到高尔基体中，有的蛋白质还需进一步修饰。在高尔基体内，蛋白质要被定向转运至最终目的地，但机制尚未完全阐明。指定要分泌到胞外的蛋白质可能通过小泡转运通过高尔基体到质膜，然后分泌到胞外。

11.8 蛋白质合成抑制剂

许多蛋白质合成抑制剂都是抗生素或毒素，其中一些用于阐明蛋白质合成的机制，例如嘌呤霉素最初就是用来研究核糖体延伸循环的抗生素。嘌呤霉素(puromycin)的结构非常类似于氨酰-tRNA 的 3′-末端的结构。因为结构相似，嘌呤霉素可以进入核糖体的 A 位，肽酰转移酶催化新生成的多肽转移至嘌呤霉素的游离氨基上(图 11.19)。由于肽酰-嘌呤霉素在 A 位处的结合弱，很快就从核糖体上解离，终止蛋白质合成。

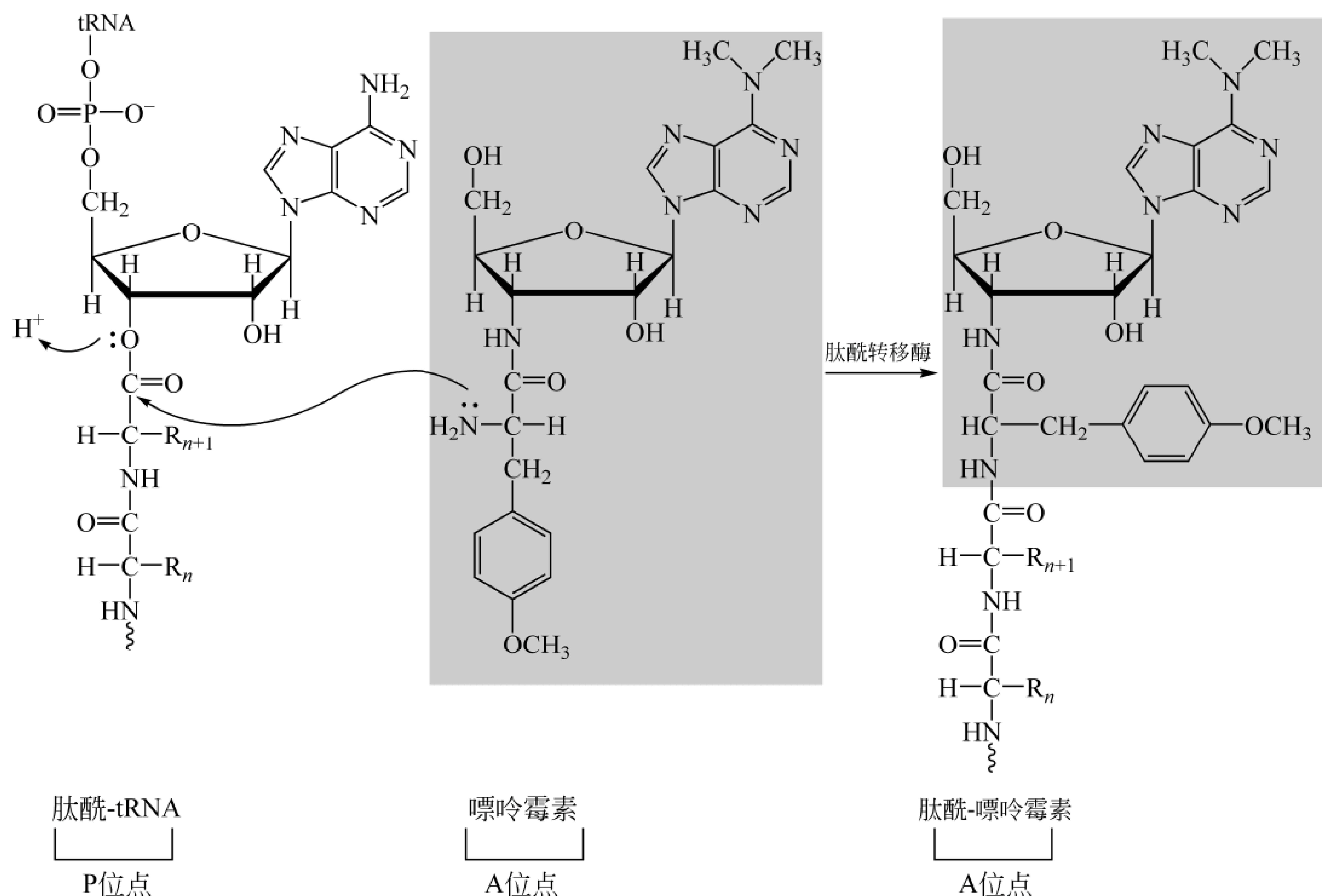


图 11.19 嘌呤霉素的作用机制

尽管嘌呤霉素可以有效地阻止原核生物的蛋白质合成，但它不能用于临床，因为嘌呤霉素同样也阻止真核生物的蛋白质合成。临床上重要的抗生素，例如，称为“广谱”抗生素的氯

霉素和四环素等抑制原核细胞,但不影响真核细胞的蛋白质合成。表11.5列出了一些蛋白质合成抑制剂和它们的作用方式。

表11.5　一些蛋白质合成抑制剂

抑　制　剂	抑制的细胞	作 用 方 式
抑制起始		
金精三羧酸(aurintricarboxylic acid)	原核细胞	阻止 IF 与 30S 亚基结合
春日霉素(kasugamycin)	原核细胞	抑制 fMet-$tRNA_i^{Met}$ 结合
链霉素(streptomycin)	原核细胞	阻止起始复合物形成
抑制延伸中的氨酰-tRNA 结合		
四环素(tetracycline)	原核细胞	抑制氨酰-tRNA 结合在 A 位
链霉素(streptomycin)	原核细胞	导致密码子错读,插入不匹配的氨基酸
摩雪霉素(kirromycin)	原核细胞	与 EF-Tu 结合,阻止由 EF-Tu-GTP 转换为 EF-Tu-GDP
抑制延伸中的肽键形成		
稀疏霉素(sparsomycin)	原核细胞	抑制肽酰转移酶
氯霉素(chloramphenicol)	原核细胞	与 50S 亚基结合,封住 A 位,抑制肽酰转移酶活性
克林霉素(clindamycin)	原核细胞	与 50S 亚基结合,使 A 和 P 位重叠,抑制肽酰转移酶活性
红霉素(erythromycin)	原核细胞	封闭 50S 亚基通道,引起早熟的肽酰-tRNA 解离
抑制延伸中的移位		
羧链孢酸(fusidic acid)	原核细胞、真核细胞	抑制 EF-Tu-GDP 从核糖体上解离
硫链丝菌肽(thiostrepton)	原核细胞	抑制核糖体依赖的 EF-Tu 和 EF-G GTPase 活性
白喉毒素(diphtheria toxin)	真核细胞	通过 ADP 核糖基化作用使 eEF-2 失活
放线菌酮(cycloheximide)	真核细胞	抑制肽酰-tRNA 移位
提前终止		
嘌呤霉素(puromycin)	原核细胞、真核细胞	氨酰-tRNA 类似物,结合在 A 位,起着肽酰基受体的作用,中断肽链延伸
使核糖体失活		
蓖麻毒蛋白(ricin)	真核细胞	使 28S rRNA 的一个特定腺苷去嘌呤,导致真核生物核糖体 60S 亚基失活

相关话题　RNAi

斯坦福医学院病理学和遗传学教授 Andrew Fire 和马萨诸塞州医学院分子医学教授 Craig Mello 因在 RNA 干扰(RNA inference,RNAi)方面的研究成果和突出贡献获得了2006年度的诺贝尔生理学或医学奖。

RNAi 指的是内源性或外源性双链 RNA(double stranded RNA,dsRNA)介导的细胞内 mRNA 特异性降解,导致靶基因表达沉默的现象。RNAi 现象最早是在1990年由 R. Jorgensen 等将一个能产生色素的基因导入矮牵牛细胞中,希望通过转基因技术使矮牵牛的紫色加深的实验中发现的。结果不但没有使花的颜色加深,反而使花的颜色呈现白色或杂色。这一现象说明导入的基因干扰了正常紫色基因的表达,使得紫色基因处于"沉默"状态,

但人们对这种现象一直没有给出一个合理的解释。

1998 年 Andrew Fire 和 Craig Mello 等将纯化后的携带编码肌肉蛋白序列的有意链 RNA、反义链 RNA 和含有义、反义链的双链 RNA 注入线虫体内,观察这 3 种 RNA 阻断基因表达的效果(图 11.20)。

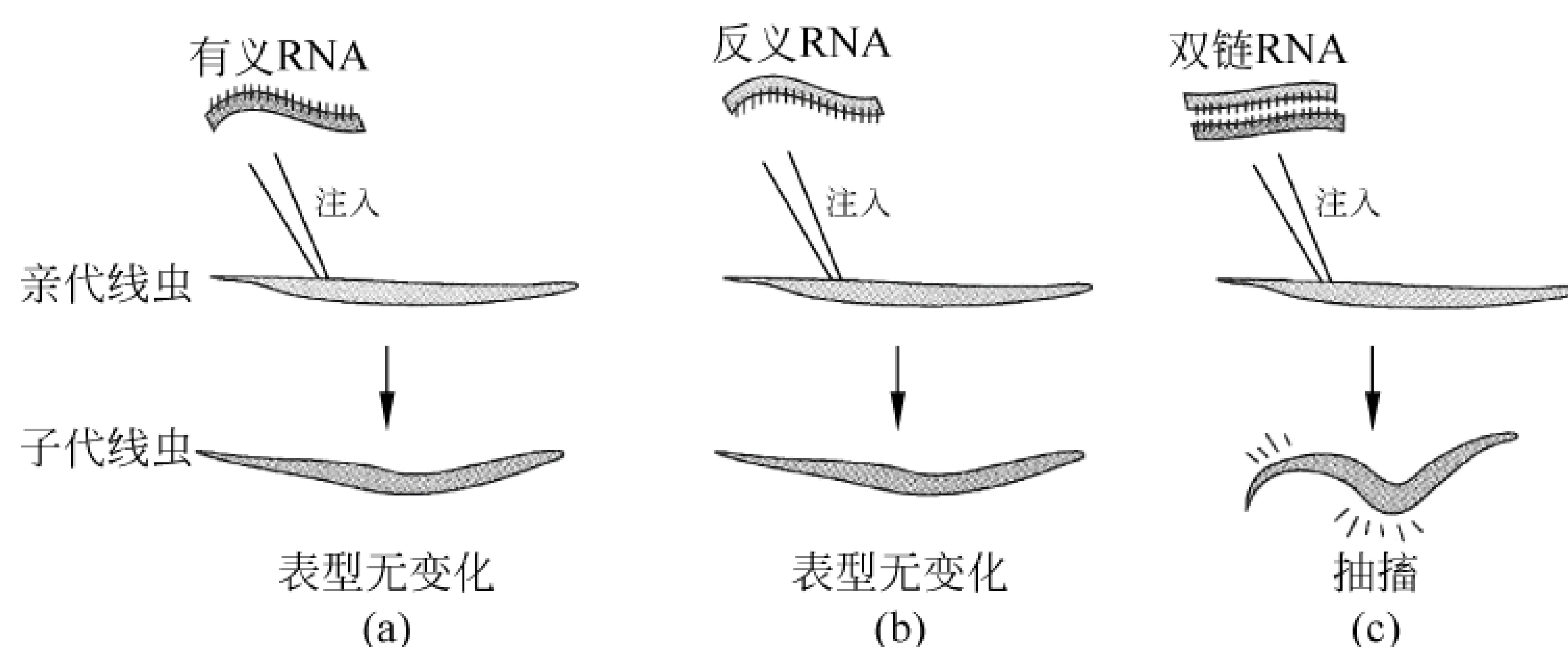


图 11.20 Andrew Fire 和 Craig Mello 的 RNAi 实验

(a) 注入有义链 RNA;(b) 反义链 RNA;(c) 双链 RNA

如图 11.20 所示,无论单独注入有义 RNA,还是反义 RNA 实验,都显示出表型无变化,说明两者阻断基因表达的效果都非常微弱。但在含有相应的有义和反义的双链 RNA 实验中,观察到线虫开始抽搐,表现出类似于肌肉蛋白缺陷型基因的线虫表现出的表型,表明双链 RNA 阻断基因表达的效果远远强于单链 RNA。他们将这种转录后基因沉默现象(PTGS)称为 RNA 干扰。

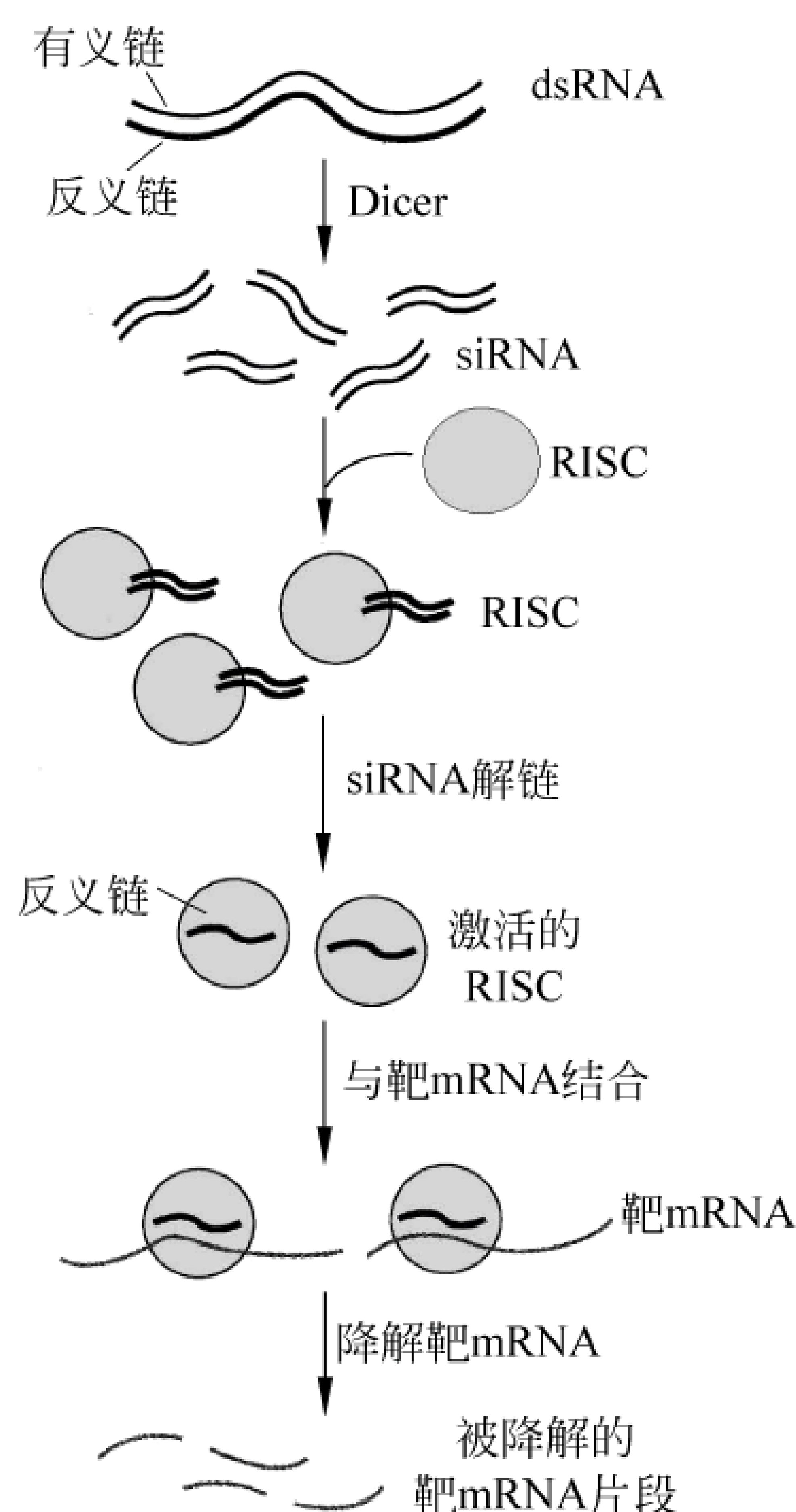


图 11.21 RNA 干扰机制的示意图

来源:Wikopedia the free encyclopedia

图11.21给出了RNA干扰阻断基因表达的分子机制示意图。细胞内双链RNA(dsRNA)首先被属于RNaseⅢ家族的内切核酸酶Dicer切成长度为19～25个核苷酸的小的RNA干扰(small interfering RNA，siRNA)片段。然后siRNA与RNA诱发的沉默复合物(RNA-induced silencing complex,RISC)结合,形成siRNA-RISC。RISC至少有4个蛋白质成分,其中有一个是依赖于ATP的RNA解旋酶,通过解旋酶使双链siRNA变成单链的siRNA。然后反义的siRNA与靶mRNA的互补序列结合,RISC的内切酶活性切靶mRNA,细胞内的核酸酶再进一步将小片段mRNA降解,由此干扰了mRNA翻译,使基因沉默。

研究发现植物、动物和人类都存在RNA干扰现象,随着对RNA干扰机制的深入研究,RNA干扰技术的完善,现在这项技术正在作为强大的“基因沉默”技术被用于实验室中基因功能的研究及以RNAi机制为基础的药物研究和开发上,设计出更安全、高效的基因药物。

小结

1. 遗传密码由非重叠的三联体核苷酸密码子构成,遗传密码具有通用性和简并性。三联体密码子的头两个核苷酸往往足以表明了编码的氨基酸,具有相似序列的密码子指定了化学上相似的氨基酸。存在着几种专门用于蛋白质合成起始和终止的密码子。

2. tRNA分子是mRNA密码子和蛋白质中的氨基酸之间的适配器。所有tRNA分子都呈现出带有一个茎和三个臂的相似的三叶草二级结构,它的三级结构为倒L形,反密码子环位于结构的一端,而受体茎位于另一端。tRNA中的反密码子与mRNA中的密码子碱基配对。反密码子的5′(摆动)位构象上有一定柔性。

3. 在氨酰-tRNA合成酶催化下,一个特定的氨基酸被加到相应的tRNA的受体茎上,生成氨酰-tRNA。一些氨酰-tRNA合成酶具有校正功能。

4. 核糖体是RNA-蛋白质复合物,它催化结合在氨酰-tRNA分子上的氨基酸的聚合。所有核糖体都是由两个亚基组成,原核生物核糖体3种rRNA,真核生物核糖体含有4种。连接了生长着肽链的tRNA处于核糖体的肽酰位(P),而连接了下一个待聚合氨基酸的氨酰-tRNA放置在氨酰位(A)。

5. 翻译开始于起始复合物的形成,该复合物由起始tRNA、mRNA模板、核糖体亚基、几个起始因子组成。在原核生物中,翻译起始发生在SD序列的下游,在真核生物中起始通常发生在紧靠mRNA 5′端的起始密码子。

6. 翻译的延伸阶段需要称为延伸因子的辅助蛋白。延伸反应分为3步:正确的氨酰-tRNA定位于A位、肽酰转移酶催化肽键形成和核糖体移位一个密码子。

7. 释放因子识别终止密码子,并催化蛋白质合成终止,同时使翻译复合物解离。

8. 大部分新生多肽链都是自发折叠成蛋白质惟一的天然构象,折叠信息储存在它的氨基酸序列中。也有一些蛋白质的折叠需要其他蛋白,例如伴侣蛋白和陪伴蛋白协助下完成折叠。

9. 许多蛋白质都要受到翻译后修饰,一些指定要分泌的真核生物蛋白质都含有用于转移至内质网的N-端信号序列。一些分泌的蛋白质被糖基化。

习题

1. 一个正链病毒用亚硝酸处理，结果使病毒 RNA 的胞嘧啶脱氨变成了尿嘧啶。用这种突变病毒去感染宿主细胞，以此来进行病毒蛋白质的合成。试问在正常蛋白中原本由 Ser 占据的某个位点在突变蛋白中可能被哪种氨基酸占据？

2. 以下哪个氨基酸可能只存在一种 tRNA？请给出解释？

(a) Phe；(b) Leu；(c) His。

3. 一个新种酵母中恰好有一种反密码子为 IGC 的 $tRNA^{Ala}$，对应的密码子是哪一个？

4. 蛋氨酸是两种只有一个密码子的氨基酸之一。这惟一的一个密码子是怎样既确定 *E. coli* 合成的多肽中的起始蛋氨酸残基，又确定肽链内部的蛋氨酸残基的呢？

5. 预测当赖氨酸密码子第一个碱基由 A 变为 G 时对蛋白质结构与功能的影响。

6. 通过先用核糖核酸酶处理 mRNA，然后再将核糖核酸酶失活和清除掉，可制备无 mRNA 的网织红细胞（未成熟红细胞）裂解物。当在此裂解物中加入 mRNA、GTP 和氨酰 tRNA 后，可合成蛋白质。利用这个系统如何阐述蛋白质合成是从 N-末端到 C-末端的？

7. 已知遗传密码是通用的，一植物 mRNA 能否在如 *E. coli* 那样的原核生物细胞中被正确翻译？

8. 细菌的基因组通常含有 rRNA 的基因的多个拷贝。为了生产出用于组装到核糖体的大量 rRNA，这些基因可高效地被转录。相反，编码核糖体蛋白的基因只有一份拷贝，试解释 rRNA 基因和核糖体蛋白基因数量的差别。

9. 利用无细胞的氨基酸整合系统进行特定蛋白质的合成实验。比较系统内含或不含嘌呤霉素时，合成出的蛋白质在(a)N-末端氨基酸、(b)C-末端氨基酸及(c)合成的肽链的平均长度各有什么不同？

10. 来自 E. coli 基因中间的一个 DNA 片段序列为 CCGGCTAAGATCTGACTAGC、按任一方向转录该片段可生成两个 mRNA 序列：CCGGCUAAGAUCUGACUAGC 和 GCUAGUCAGAUCUUAGCCGG。假设该 DNA 片段来自编码蛋白质的基因的中间一段，哪个 mRNA 是最有可能的实际转录物？给出它编码的多肽的序列。

11. 在某些种类的细菌中，密码子 GUG 起始蛋白质合成。合成后的蛋白质在 N-端总含有蛋氨酸。起始 tRNA 是怎样与 GUG 配对的？这一现象与摆动有关吗？

12　代 谢 导 论

前面各章描述了活细胞中主要成分的结构和功能，其中包括氨基酸、核苷酸等那样的小分子，也包括像蛋白质、核酸那样的多聚物，还包括像膜那样的聚合体等。但活细胞不是静止的分子组装体，虽然有些细胞成分是稳定的，但有些成分却在进行快速地转换，就是说处于不断地合成和降解中，不过它们在细胞内的浓度保持稳定。从本章开始描述的重点将集中在已经描述过的细胞成分的降解、转化和合成的生物化学活动上。简言之，我们将从细胞结构的静态观点转移到细胞功能的动态特性方面。

12.1　合成代谢和分解代谢

从广义上讲，可以将代谢描述为发生在活细胞内的所有化学反应，这些反应又分为合成代谢反应（anabolic reaction）和分解代谢反应（catabolic reaction）。通过分解代谢反应，生物大分子在被降解成小的构件分子的同时释放出大量能量；活细胞利用释放的能量驱动合成代谢反应，合成能够提供细胞维持和生长所需的生物分子（图 12.1）。当然细胞还利用捕获的能量执行其他任务，例如跨膜运输和细胞运动等。

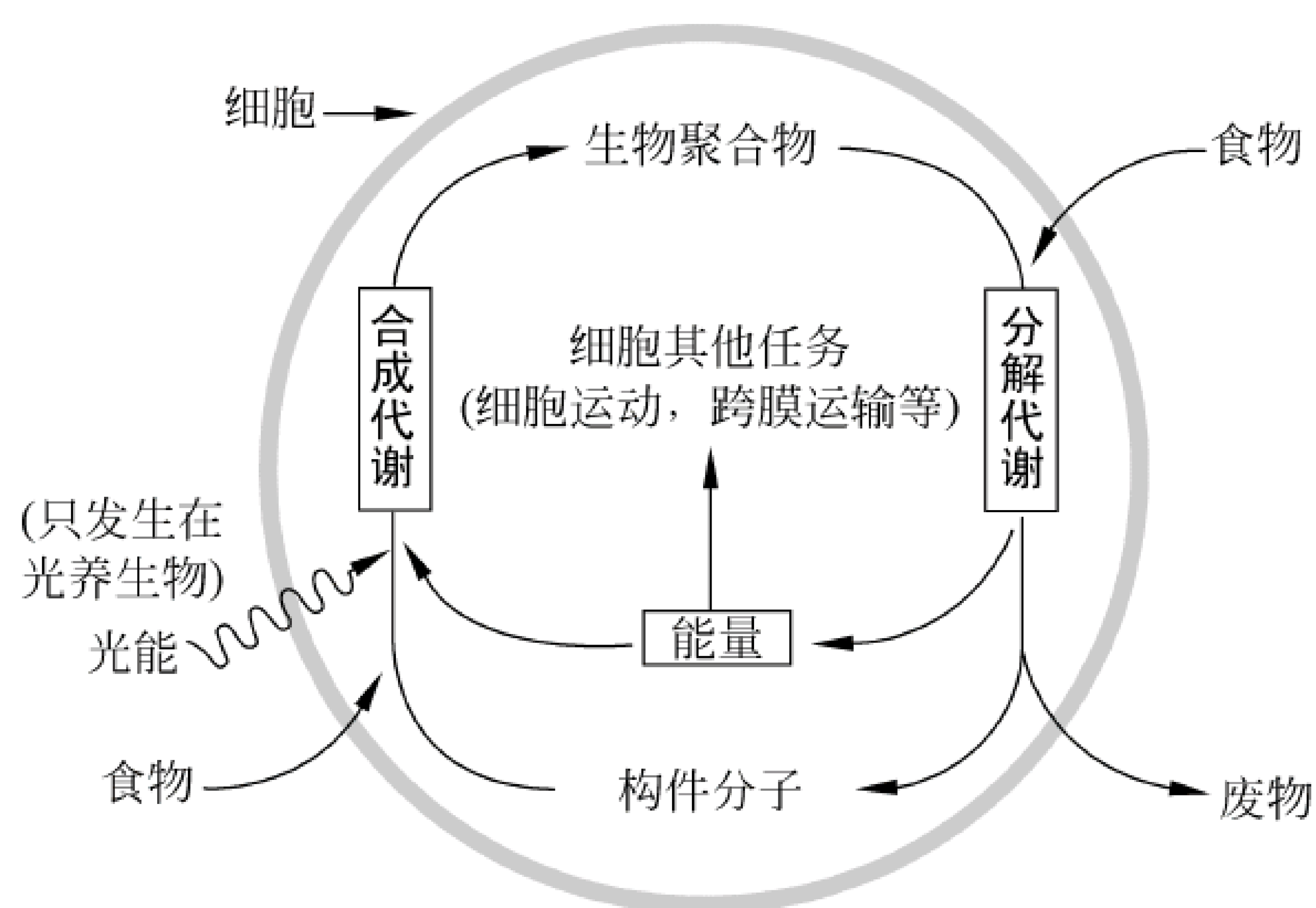


图 12.1　合成代谢和分解代谢

由于绝大多数代谢反应在酶的催化下很容易进行，所以代谢的完整描述不仅包括反应物、中间代谢物和反应产物，而且还应包括催化反应的酶的特性的描述。在详细讨论各种生物分子的代谢之前，有必要对代谢的全貌有一大致的了解。细胞中代谢分为合成代谢和分解代谢，细胞代谢活动中的很大一部分是属于生物合成反应，而分解代谢在伴随着物质代谢的同时又能产生大量的可用于生物合成的能量。

12.1.1　合成代谢

合成代谢或称为同化代谢是生物生长和繁殖最重要的途径，图 12.2 给出的是通常生物合成途径的概图。所有的细胞都要从外部获取碳、氢、氧、磷、硫源以及无机离子源。一些称为自养生物(autotrophs)的生物，如细菌和植物可以利用这些必需元素的无机源，而异养生物(hetrotrophs)，如动物需要像葡萄糖那样的有机碳源。

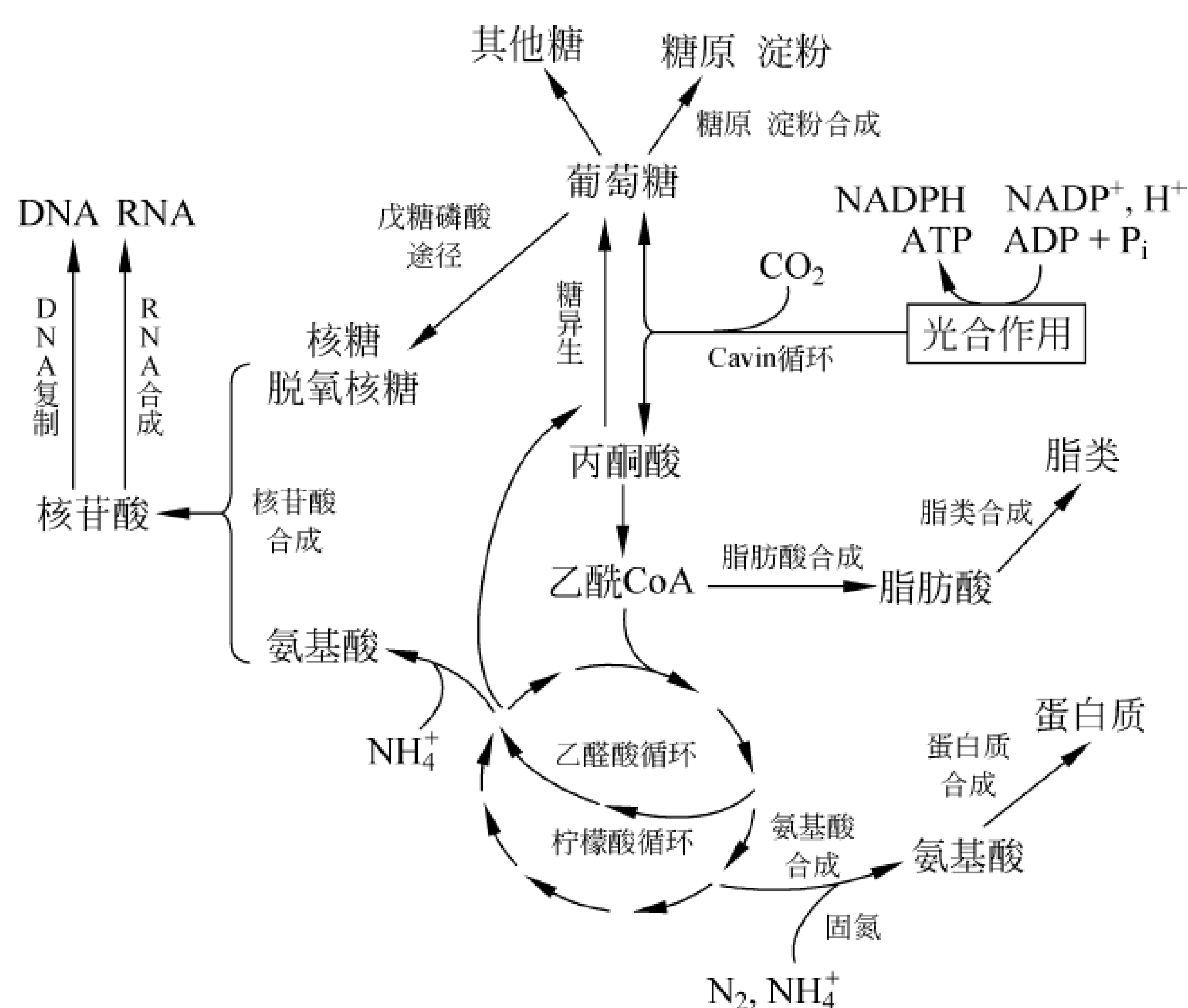


图 12.2　合成代谢途径

从图 12.2 可看出，大分子由比较小的分子通过加碳(通常以 CO_2 形式)和氮(通常以 NH_4^+ 形式)合成的。在第 15 章和第 17 章将分别描述糖原合成、经糖异生的葡萄糖合成以及淀粉合成。第 18 章将描述脂肪酸的合成。在前面的第 9、10 章和第 11 章分别描述了 DNA 复制、RNA 合成和蛋白质合成，但没有涉及它们的构件分子脱氧核苷酸、核苷酸和氨基酸的生物合成，这些内容将于第 20 章和第 19 章予以描述。

值得注意的是主要的途径都涉及柠檬酸循环，该循环可提供氨基酸生物合成及糖异生的前体。生物合成需要的能量通过太阳光由光合(作用)生物或通过氧化像 NH_4^+，H_2 或 H_2S 那样的无机分子由其他自养生物中制造有用代谢能，这些代谢能再被用于合成富含能量的 ATP 和 NADH 还原能。ATP 和 NADH 再将它们储存的能量用于生物合成反应。

12.1.2　分解代谢

图 12.3 给出了主要的分解代谢途径，一般来说，这些降解途径并不是生物合成途径的简单逆转。要注意的是柠檬酸循环在分解代谢中仍然像在合成代谢中那样是一个主要的途径。分解代谢的主要作用就是清除机体内不想要的分子和产生可用于其他过程的能量。

从图 12.3 中看到大分子营养物蛋白质、多糖、脂等通过酶催化水解降解成它们相应的构件分子氨基酸、葡萄糖、脂肪酸等，这些构件分子在氧化反应中再进一步降解，伴随着物质

分解代谢的同时,也产生了大量的化学能,这些能量一般都是以核苷三磷酸(例如ATP或GTP)和还原型辅酶(例如NADH或QH_2)形式保存,而还原型辅酶最终经电子传递和氧化磷酸化也转换为能量载体ATP。

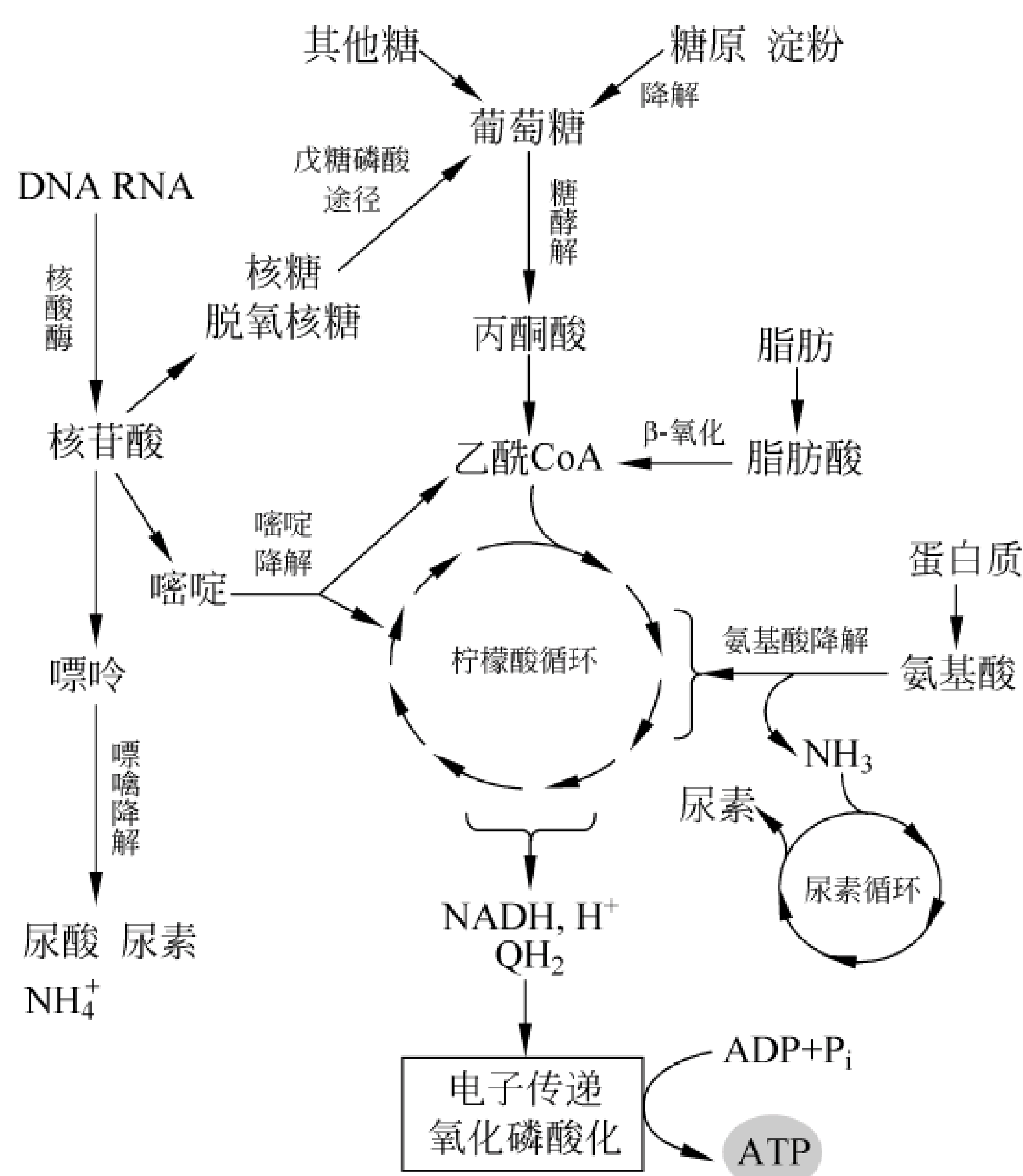


图 12.3 分解代谢途径概图

第一个描述的代谢途径是第13章的糖酵解,糖酵解是葡萄糖分解代谢的惟一途径。在该途径中作为己糖的葡萄糖被降解为两个3碳代谢物,同时在称为底物水平磷酸化过程中可以产生ATP。糖酵解的产物通常为丙酮酸,它可以进一步被氧化转化为乙酰CoA。这一章还描述了糖酵解支路戊糖磷酸途径,通过这一途径葡萄糖被氧化可以产生用于生物合成途径的NADPH和用于核苷酸合成的核糖。

第14章描述的柠檬酸循环可很容易地将乙酰CoA的乙酰基中二碳单位完全氧化为CO_2。氧化中释放的能量以ATP和NADH形式保存起来。第15章描述了糖原代谢和由一些前体合成葡萄糖的糖异生作用。

ATP的产生是代谢中最重要的反应,绝大多数ATP的合成都是与膜结合的电子传递偶联(第16章)。在电子传递中储存在像NADH那样的还原型辅酶中的能量都被用于产生跨膜的电化学质子梯度。质子梯度的电势能被用来驱动ADP磷酸化生成ATP。第17章光合作用中捕获光能的反应在许多方面与第16章的膜结合电子传递反应及偶联的ATP合成相似。

第18章将描述以三酰甘油为营养物储存的脂肪降解和接下来的脂肪酸氧化。这一章还将给出脂肪酸、脂肪以及磷脂的生物合成。氨基酸的降解和合成将在第19章介绍,氨基酸既是蛋白质的构件分子,也作为代谢燃料和生物合成的前体起着重要的作用。第20章将重点描述核苷酸的合成,而核苷酸的分解代谢途径主要用于排泄,而不是像糖、蛋白质和脂肪那样用于产生能量。

12.2 代谢途径的区室化

绝大多数代谢途径都局限于细胞内的特定区域，称为区室化（compartmentation）。所谓区室（compartment）指的是有界膜的细胞器，例如内质网、线粒体、叶绿体、高尔基体、过氧化物酶体等。区室化使得各个细胞器内的代谢物、酶、代谢途径或其他生物分子或系统的分布明显不同。图 12.4 给出了真核细胞内主要代谢途径的位置。在缺乏细胞器的原核细胞中，不同代谢过程也局限于细胞内的特定区域。

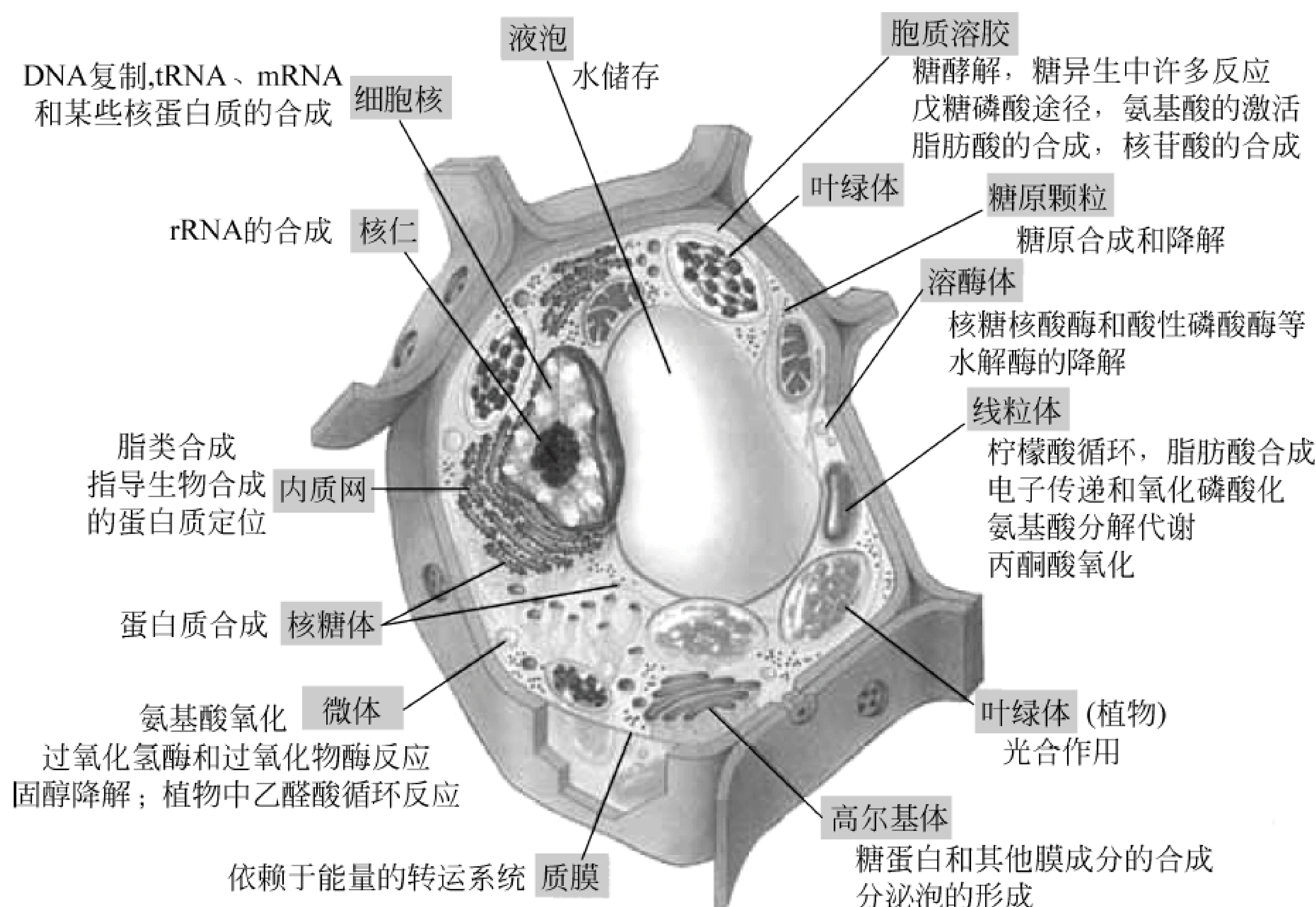


图 12.4 真核细胞内主要代谢途径的位置

图中细胞是个结合了植物细胞和动物细胞特征的假想细胞

由图 12.4 可看出，在真核细胞内通过区室化将不同的代谢途径完全分隔在特定的细胞器中。例如催化脂肪酸分解的酶分布在线粒体内，而催化脂肪酸合成的酶分布在胞质溶胶中。区室化使得各个细胞器拥有独立的代谢物池，这样安排可允许方向相反的代谢途径同时进行。

另外，区室化通过区室的通透特性也可以调节酶促反应。因为区室膜可有选择地调控底物进入区室和产物输出区室，所以区室内底物和产物的相对浓度同样可影响酶促反应。当然膜上的特殊的运输蛋白起着重要作用，它们的存在使得代谢物容易进入和输出。

此外，区室化与一些激素作用紧密相连，这些激素直接影响代谢物跨细胞膜或细胞器膜的转运，所以维持各个区室内拥有不同代谢物浓度也取决于细胞表面受体和信号转导机制的存在，使得各个细胞能够响应不同的激素或神经信号。

12.3 代谢调控

尽管在每个细胞内都存在着大量的酶和代谢物，但代谢并不是随机的，而是受到高度调控的。如果每个可能的代谢反应在所有的时间内都是以固定的速度反应，那么生物体就不

能适应它周围环境的变化。例如有机体可以间断地摄取能量(例如吃饭),但有机体要连续地消耗能量,因此代谢需要调节,以便有机体能有效地利用能量或食物。当不能摄取食物,但又需要连续地消耗能量时,代谢的燃料由储存的地方被“调运”出来供给需能的细胞,这些代谢过程都受到了严密的调控。

代谢的调控可以说是激素的调控,当然激素的释放有时又受到神经系统的控制。激素调控的最终表现形式是酶量和酶活性的调节。酶量的调节取决于酶合成的速率和降解速率,受基因控制,可以按照代谢需要调控酶的合成。

酶活性的调节包括酶的别构调节和共价调节,在酶一章已经作了介绍。别构激活剂和抑制剂通常都是一些小分子,它们可以通过诱导作用影响催化构象变化来快速地改变酶的活性。在代谢部分将看到别构调节的很多例子。

酶的活性也可以通过共价修饰快速和可逆地调节,大多数共价修饰都是磷酸化和去磷酸。磷酸化通常都是由蛋白激酶催化,在酶或蛋白质中的丝氨酸、酪氨酸或苏氨酸残基上加上一个磷酸基团,激活酶或使酶失活。通过磷酸化可以使靶蛋白中的特定构象稳定,也可以阻止底物或其他配体接近该蛋白质的结合部位。已磷酸化的蛋白质通过磷酸酶可去磷酸化,使酶失活或恢复酶活性。

高效的调节作用存在于几乎所有的生物中。例如当可利用氧时,酵母细胞有能力将葡萄糖完全氧化为二氧化碳;当氧缺乏时,酵母可以很容易地转向葡萄糖的发酵,产品为乙醇。通过增加蛋白质合成或降解可以改变特定酶的量,但相对于别构、共价激活或抑制作用,这种调节过程通常都比较慢。

代谢途径的物质流不仅取决于底物的供应和产物的移去,也取决于催化途径中几个关键反应的酶活性,这些反应大都是途径中的不可逆反应,所以酶活性的调节主要是催化关键反应的酶活性的调节。

代谢途径经常遇到的代谢调控作用是反馈抑制作用,反馈抑制在酶一章已经讲到。当一个途径的产物(通常是终产物),通过抑制途径前面的一步关键反应(通常是途径中的第一个关键反应)而控制它自己合成的速度时,就发生反馈抑制作用。在生物合成中这样的调节方式的作用是显而易见的。例如,嘧啶核苷酸合成的终产物 CTP 就是通过反馈抑制前面由天冬氨酸转氨甲酰酶催化的关键反应。

12.4 热力学原理

为了理解代谢中的平衡、物质流及能量流,首先要了解热力学的基本原理。代谢中的每一个反应都涉及物质和能量。物质的转运是直观的,可以通过反应物内原子的转移表示,化学反应中的能量转移则是非直观的,而有关能量的信息似乎并没有出现在化学方程式中。定性地了解能量转移还是需要的,以便确定一个反应能否在试管中和在细胞中进行。

吉布斯自由能(Gibbs free energy)G 是生物化学中主要的热力学函数。通过自由能可以推测出反应能否自发进行,是放能反应,还是耗能反应。测定任何过程或物质的实际自由能很困难,一般都是测定自由能的变化(ΔG),ΔG 表示产物和反应物自由能之间的差值。如果 ΔG 为负值($\Delta G<0$),反应可自发进行,是个放能反应;如果 ΔG 为正值($\Delta G>0$),反应需要外界提供能量才能进行,表明是个耗能反应。

自由能变化与另外两个热力学函数——焓(enthalpy)和熵(entropy)有关，在标准温度和压力下，它们之间的关系可表示为：

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{12.1}$$

式中，ΔH 为焓变；ΔS 为熵变；T 为热力学温度。

自由能变化取决于反应发生的条件。自由能变化都要涉及人为选择的参考状态(称为标准态)，标准态表示特定条件下的状态。对于溶液化学，规定在标准温度为 298K(25℃)，标准压力为 101 325Pa(1atm)，标准溶质浓度为 1.0mol/L 状态下的自由能变化为标准自由能变化，用 $\Delta G^{\ominus}$ 表示。

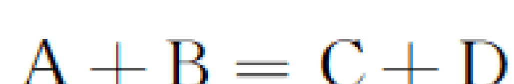
对于生物化学，化学的标准态稍有一些修改，因为大多数生物化学反应都发生在 pH7.0 附近，所以生物学标准态中的氢离子标准浓度是 10^{-7} mol/L(pH=7.0)，而不是 1.0mol/L (pH=0.0)，所以在生物学标准态下的自由能变化用 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 表示。

一个反应的标准自由能变化与反应的平衡常数有如下关系：

$$\Delta G^{\ominus}{}' = -RT\ln K_{eq} \tag{12.2}$$

式中，R 为气体常数[8.315J/(K·mol)]；T 为热力学温度；自由能单位用 kJ/mol 表示。显然，如果知道了 K_{eq}，可以计算出 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 值，反之亦然。

然而，并不是所有反应开始时反应物和产物的浓度都是 1.0mol/L，对于反应



$$A + B = C + D$$

实际的自由能变化可以表示为：

$$\Delta G = \Delta G^{\ominus}{}' + RT\ln\frac{[C][D]}{[A][B]} \tag{12.3}$$

由于 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 是常量，在给定反应中是不变的，所以实际自由能变化(ΔG)是反应物和产物浓度以及温度的函数。当反应自发地朝着平衡点进行时，ΔG 总是负值，A 和 B 浓度逐渐减小，而 C 和 D 浓度逐渐上升。随着反应的进行，ΔG 的绝对值逐渐变小，达到平衡点时($\Delta G=0$)，A、B、C 和 D 都达到平衡浓度，此时方程(12.3)变成了如下形式：

$$0 = \Delta G^{\ominus}{}' + RT\ln\frac{[C]_{平衡}[D]_{平衡}}{[A]_{平衡}[B]_{平衡}}$$

$$\Delta G^{\ominus}{}' = -RT\ln K_{eq}$$

评价在特定细胞内一个反应的自发性和方向的标准是 ΔG，而不是 $\Delta G^{\ominus}{}'$。ΔG 为负值，反应的 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 也可能为正值，但方程(12.3)中的 $RT\ln$[(产物)/(反应物)]项的值为负值，而且其绝对值比 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 大。

对活细胞中的所有反应来说，ΔG 值至少应当是稍负的值，而对于不可逆反应，ΔG 不仅是负值，而且其绝对值应当很大。代谢途径中的调控部位一般都是代谢中的不可逆反应，催化这些反应的酶都受到某种方式的调控，代谢中的不可逆反应其作用像是交通中的瓶颈，控制着代谢的进程。

12.5 高能化合物

高能化合物习惯上指的是水解时 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 负值大于 −25kJ/mol 的化合物。例如 ATP 水解自由能 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 为 −30.5kJ/mol，而 AMP 的 $\Delta G^{\ominus}{}'$ 为 −14.2kJ/mol，因此 ATP 是高能化合

物,而 AMP 为低能化合物。当讲到 ATP 和其他富含能量的磷酸化合物时,经常使用高能磷酸化合物概念。

虽然像葡萄糖那样的燃料分子完全氧化可以释放相当多的能量($\Delta G^{\ominus\prime}=-2850$kJ/mol),但氧化过程是逐步进行的,所以过程中每一放能反应释放的自由能除了直接产生 ATP 外,也会以一些富含能量的高能磷酸化合物形式储存起来。除了高能磷酸化合物以外,在以后的许多章节中还会遇到在代谢中起着基团转移作用的富含能量的硫酯。

12.5.1 高能磷酸化合物

在下面的糖代谢中,作为燃料的葡萄糖完全氧化时会产生大量能量,但这些能量首先以几种高能磷酸代谢物保存,水解时可释放大量能量。表 12.1 给出了一些代谢物水解的标准自由能,一般将大于等于 ATP 水解标准自由能的磷酸化合物称为高能磷酸化合物,所以表中的葡糖-1-磷酸、葡糖-6-磷酸及甘油-3-磷酸都归属于低能磷酸化合物。

表 12.1 一些磷酸化合物水解的 $\Delta G^{\ominus\prime}$ 值

代 谢 物	$\Delta G^{\ominus\prime}$/(kJ/mol)
磷酸烯醇式丙酮酸	−61.9
1,3-二磷酸甘油酸	−49.4
磷酸肌酸	−43.1
磷酸精氨酸	−32.2
ATP+H_2O ⟶ ADP+P_i	−30.5
ATP+H_2O ⟶ AMP+PP_i	−45.6
ADP+H_2O ⟶ AMP+P_i	−32.8
AMP+H_2O ⟶ 腺苷+P_i	−14.2
焦磷酸(PP_i)+H_2O ⟶ 2 P_i+H^+	−19.2
葡糖-1-磷酸+H_2O ⟶ 葡萄糖+P_i	−20.9
葡糖-6-磷酸+H_2O ⟶ 葡萄糖+P_i	−13.8
甘油-3-磷酸+H_2O ⟶ 甘油+P_i	−9.2

从表 12.1 可看出像磷酸烯醇式丙酮酸等一些高能磷酸化合物水解释放的能量比由 P_i 和 ADP 合成 ATP 所需能量高很多,因此通过从这些高能磷酸化合物转移磷酰基团给 ADP 可直接生成 ATP(图 12.5)。

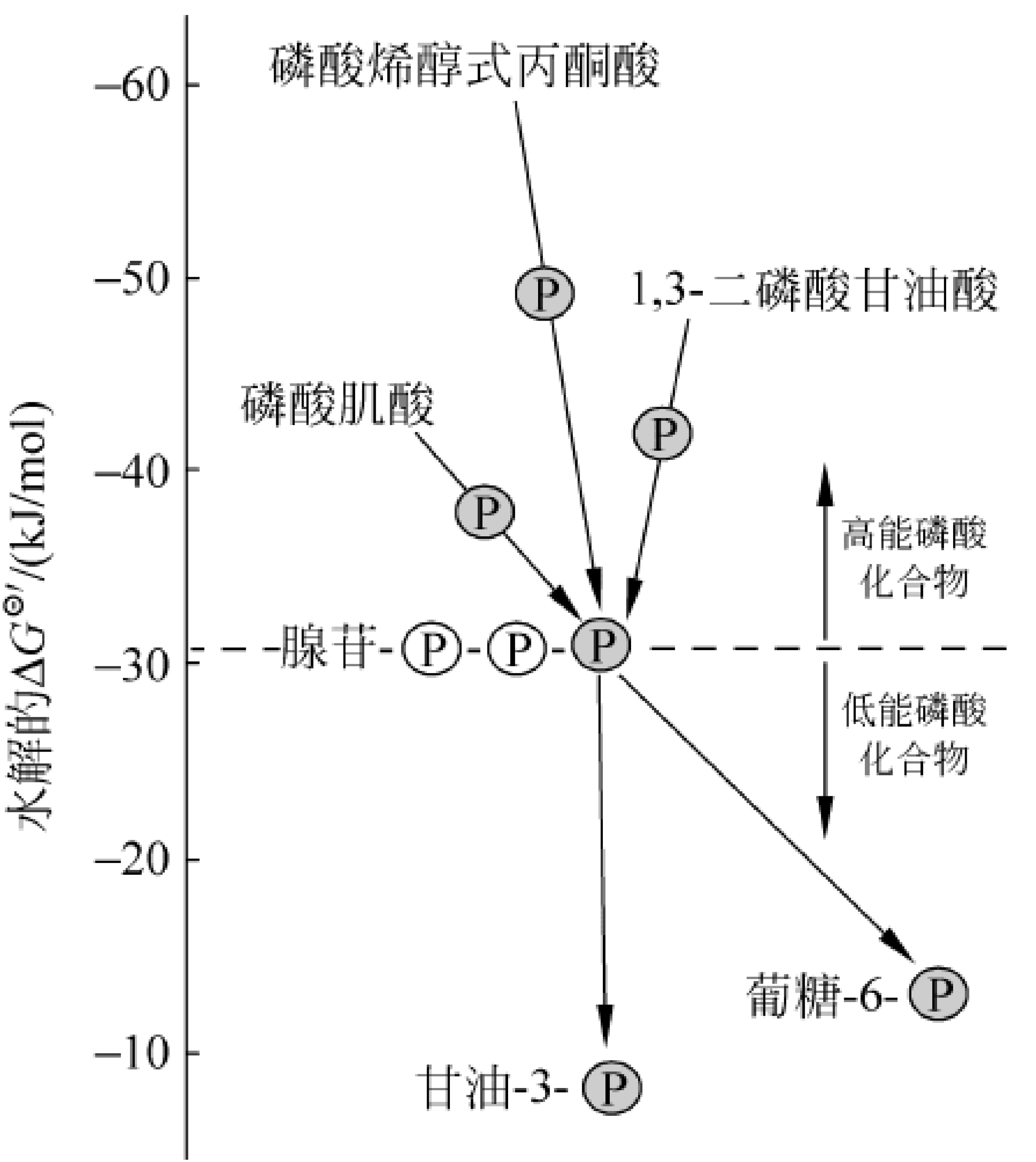


图 12.5 磷酸化合物的水解 $\Delta G^{\ominus\prime}$

由高能磷酸化合物转移磷酰基团给 ADP,可生成 ATP

表 12.1 中还给出了称为磷酸原(phosphagen)的储备高能磷酸化合物磷酸肌酸(phosphocreatine)和磷酸精氨酸(phosphoarginine)。这些化合物也为 ATP 的再生提供了一个“高能”库。例如,在脊椎动物肌肉中,磷酸肌酸在肌酸激酶催化下可以将磷酰基转移给 ADP 形成 ATP(图 12.6)。当 ATP 浓度高时,反应朝净合成磷酸肌酸方向进行。在静止的肌肉中,磷酸肌酸浓度大约是 ATP 的 5 倍。在一些无脊椎动物,如龙虾的肌肉中,磷酸精

氨酸像磷酸肌酸那样履行着同样的功能。

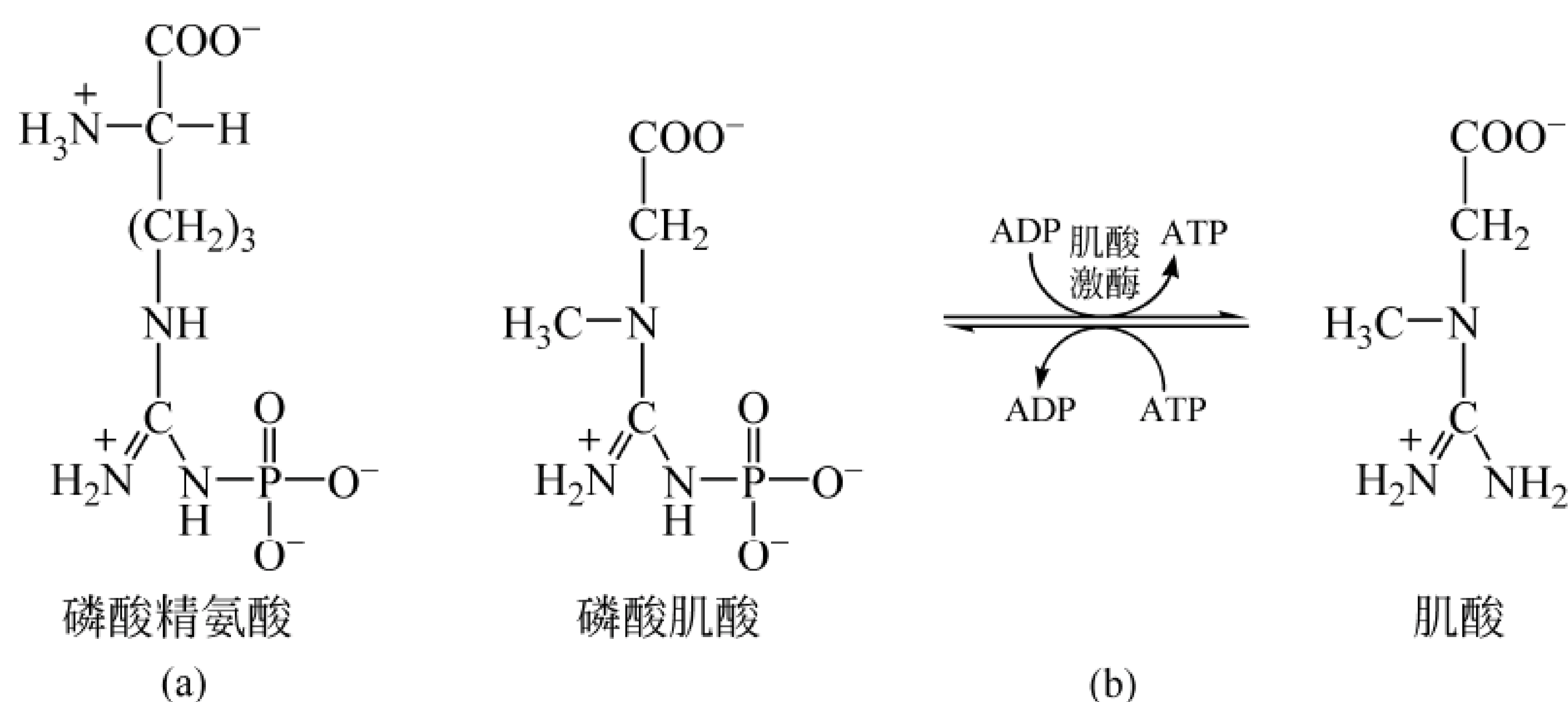


图 12.6　磷酸精氨酸和磷酸肌酸

（a）磷酸精氨酸结构；（b）磷酸肌酸结构，肌酸激酶催化磷酸肌酸与肌酸之间转换产生 ATP 或储存能量

ATP 和其他的核苷三磷酸化合物——UTP、GTP 和 CTP，常被称作富含能量的代谢物。它们几乎具有相同的水解（或形成）标准自由能，核苷酸之间磷酰基团转移的平衡常数接近 1.0，所以评估代谢中能量时，消耗的其他核苷三磷酸常用等价的 ATP 表示。

代谢中燃料氧化产生的能量大都转换成了 ATP。ATP 是个核苷三磷酸，含有一个由 α-磷酸与核糖 5′-氧形成的磷酸酯键和两个由磷酸基团 α 与 β 之间、β 与 γ 之间形成的磷酸酐键。ATP 因水解条件不同，可生成 ADP 和 P_i 或 AMP 和 PP_i，并释放出大量能量（图 12.7）。

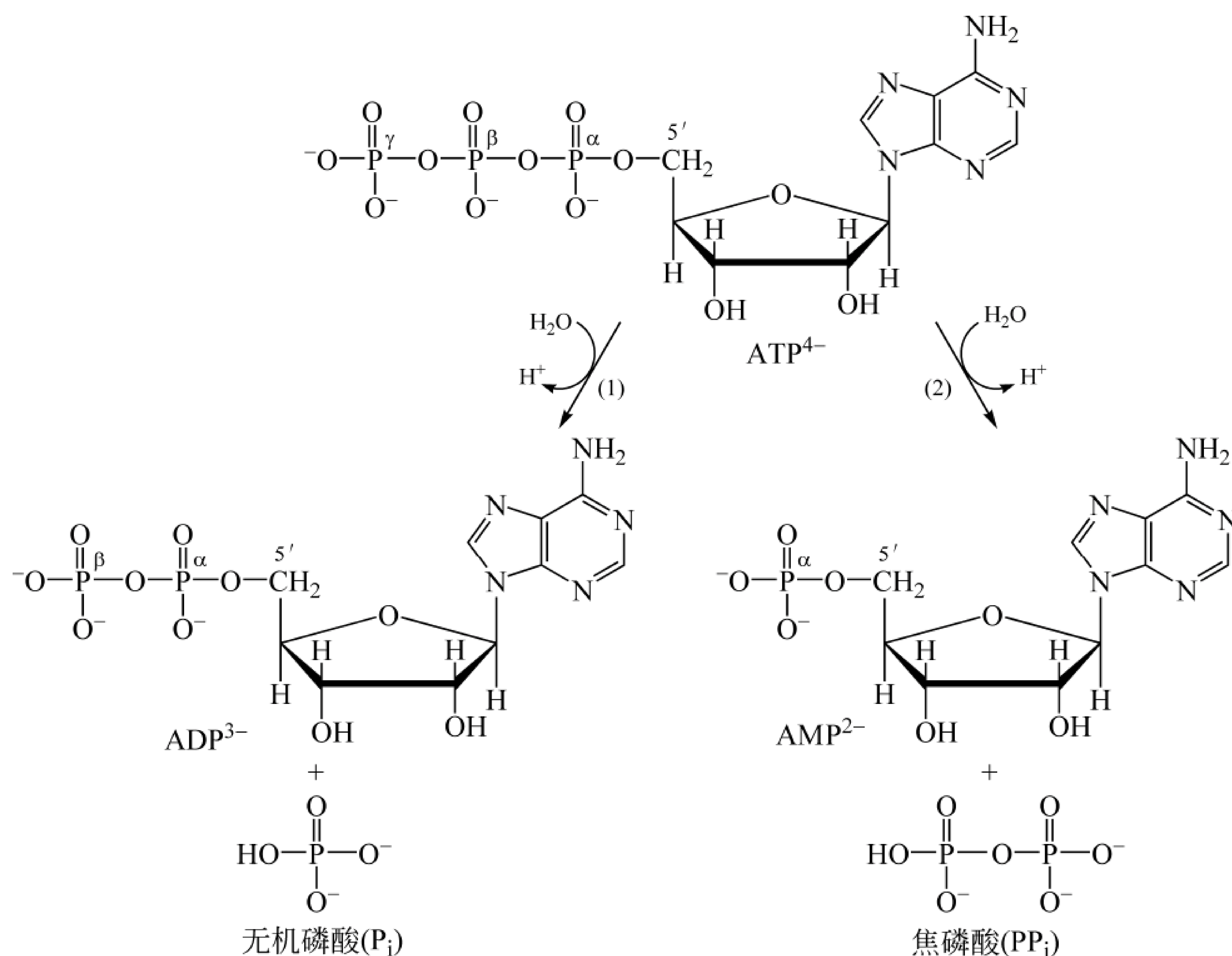
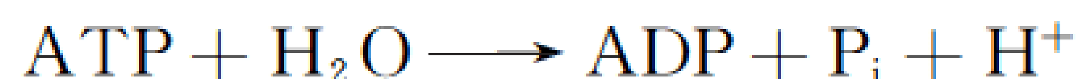


图 12.7　ATP 水解

（1）生成 ADP 和磷酸；（2）生成 AMP 和焦磷酸

由于ATP水解可提供能量,所以在代谢反应中经常可以看到如下那样的一个由X和Y合成X—Y的反应与ATP水解反应偶联,利用ATP水解释放的能量驱动合成反应进行。


$$X+Y \longrightarrow X-Y$$


$$ATP+H_2O \longrightarrow ADP+P_i+H^+$$

在多数情况下,偶联反应都是通过一个共享的中间产物,例如上述的反应物X的磷酸化衍生物X—P偶联在一起的。然后X—P与第二个底物Y反应完成整个合成反应。


$$X+ATP \longrightarrow X-P+ADP$$


$$X-P+Y+H_2O \longrightarrow X-Y+P_i+H^+$$

例如,谷氨酰胺合成酶催化谷氨酸合成谷氨酰胺的反应,底物谷氨酸被ATP磷酸化而激活,激活的谷氨酸再与NH_3反应合成谷氨酰胺(图12.8)。

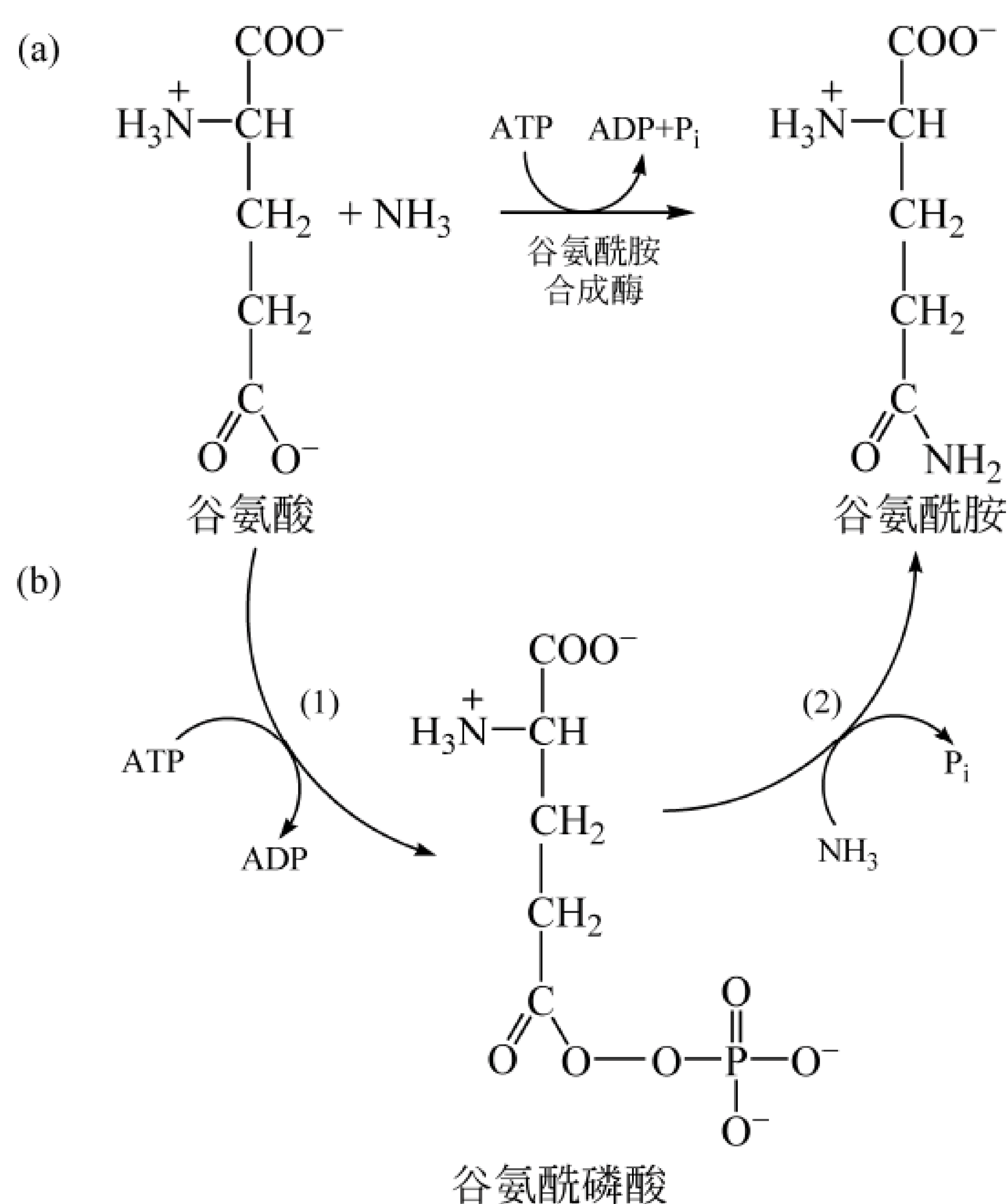


图12.8 谷氨酰胺合成酶反应

(a)以一步反应式表示;(b)以两步反应表示合成过程;

(1)ATP的γ-磷酰基转移到谷氨酸上,(2)NH_3取代了P_i生成谷氨酰胺

此外,在下面代谢中还将看到ATP还通过转移焦磷酰和腺苷酰基(AMP)驱动反应进行。例如,氨基酸在氨酰-tRNA合成酶催化下生成氨酰-tRNA时,首先ATP提供AMP形成氨酰-AMP,然后tRNA取代AMP形成氨酰-tRNA,AMP没有出现产物中(图12.9)。

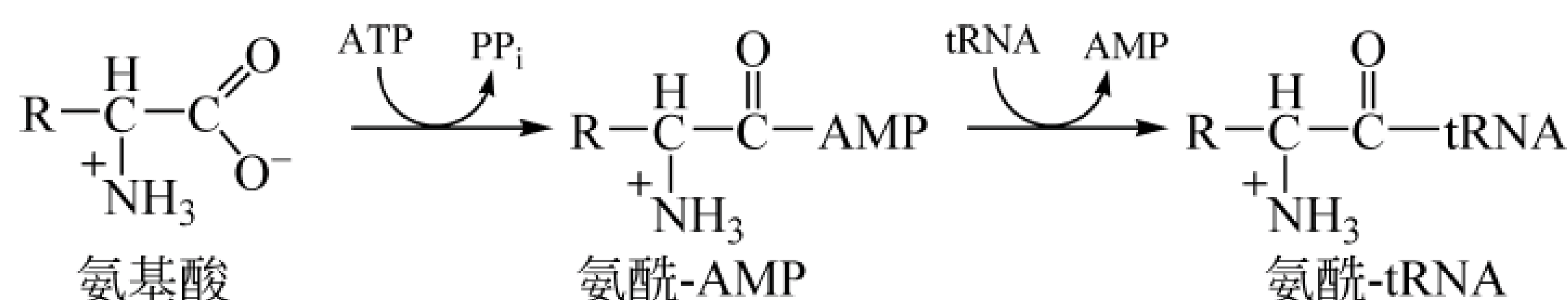


图12.9 氨酰-tRNA合成反应

ATP提供AMP

相关话题 肌酸补品能提高运动成绩吗？

一个体重70kg人的肌酸池约为120g，来源于肉食中的肌酸和人体由前体精氨酸、甘氨酸和蛋氨酸合成的肌酸。肌酸池中的95%都储存在骨骼肌和平滑肌中，其中约70%为磷酸肌酸形式。每天补充含有20～30g肌酸的补品，持续4～21天，可以使那些以前肌酸水平低的一些人的肌酸池增加高达50%。此后如果每天补充2g将会维持已升高的肌酸储备。

研究表明肌酸补品对高强度、时间短项目(例如举重)的运动成绩可能有一定程度提高，但对耐力项目(例如中长跑)就没有益处。作用上的差别从磷酸肌酸作为肌酸激酶底物的作用来看是有道理的，因为肌酸激酶利用它可由ADP再生ATP。激烈肌肉活动很快耗尽ATP供给(不到2秒)，但肌肉内磷酸肌酸浓度足以恢复ATP水平3～4秒。肌酸作为运动员的膳食补品用来增加肌肉强度非常普遍。不过在选择肌酸作为运动营养补品之前，最好先咨询一下医生或营养师。

12.5.2 硫酯

硫酯是另一类高能化合物。在辅酶和维生素一章讲到辅酶A(HS-CoA)是酰基载体，酰基通过硫酯键与辅酶A相连形成硫酯酰基CoA。例如，出现在代谢中心位置的乙酰CoA，水解$\Delta G^{\ominus\prime}$是-31.4kJ/mol，与ATP水解相当[图12.10(a)]。硫酯可被用于产生等当量ATP或将酰基转移给受体分子。例如下面介绍的柠檬酸循环中琥珀酰CoA水解释放的高能量就被用来驱动GDP(或ADP)和P_i合成GTP(或ATP)[图12.10(b)]。

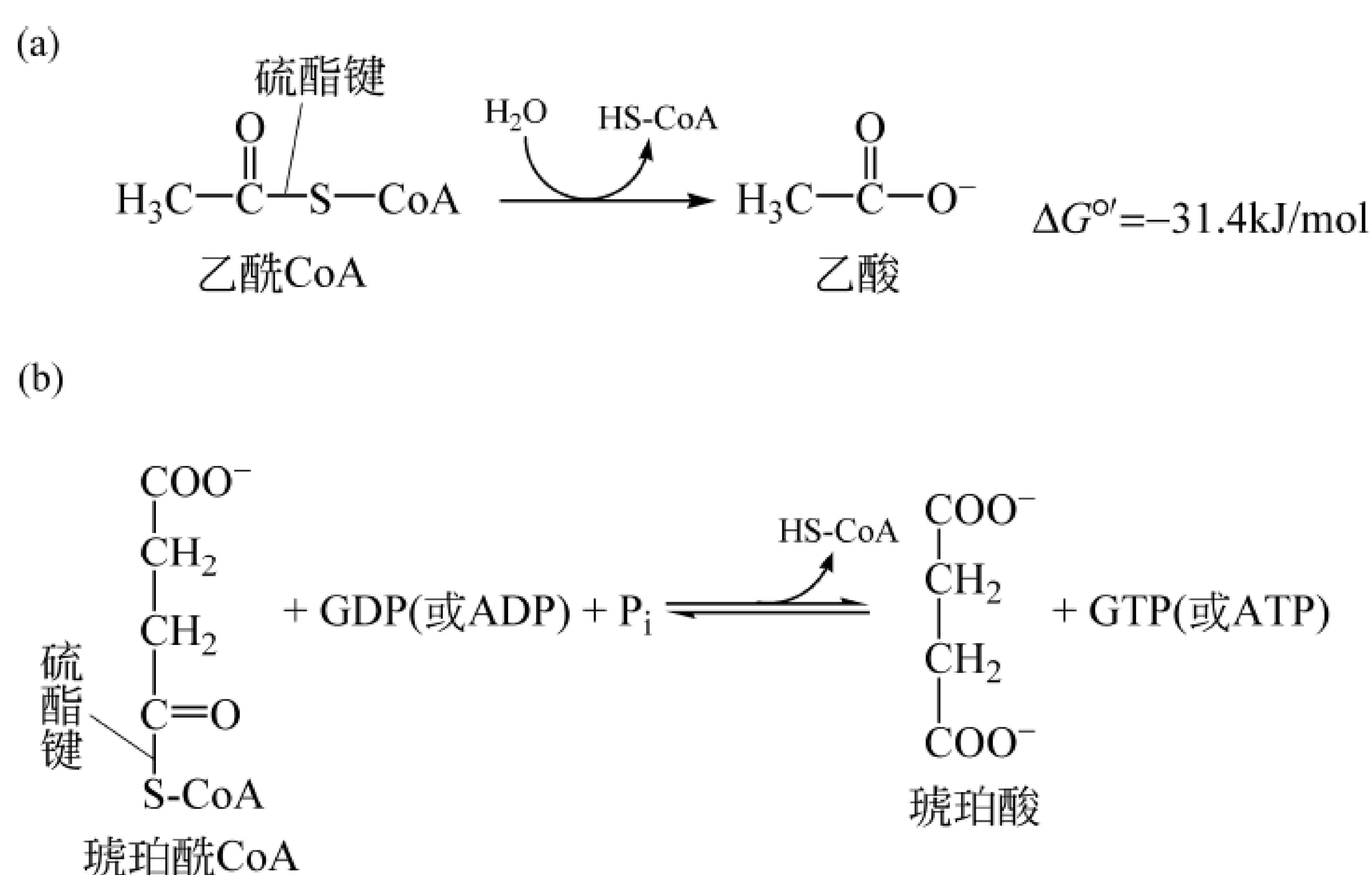


图12.10 乙酰CoA和琥珀酰CoA

(a) 乙酰CoA水解反应；(b) 琥珀酰CoA与GDP(或)和P_i反应

12.6 还原型辅酶——另一类"高能"化合物

按照高能化合物的定义,许多还原型辅酶也是"高能"化合物,它们的高能量(或称为还原力)可贡献于氧化还原反应。由于还原型辅酶的氧化可以与ATP的合成偶联,所以它们的能量可以以等价ATP表示。

在氧化还原反应中,一个分子的氧化应当与另一个分子的还原相偶联。接收电子而被还原的分子是氧化剂,失去电子而被氧化的分子是还原剂。在生物氧化反应中释放的电子经酶催化通常被转移给像 NAD^+、$NADP^+$、FMN、FAD 或辅酶 Q 那样的氧化剂,生成还原型辅酶或黄素辅酶 NADH(H^+)、NADPH(H^+)、$FMNH_2$、$FADH_2$ 或 QH_2。这些还原型辅酶可提供还原力。

12.6.1 还原电位和 Nernst 方程

氧化还原反应与其他类型的基团转移反应类似,但转移的只是电子,而不是基团。氧化还原反应可分成两个半反应,也称为氧化还原对。例如反应:



$$Zn + Cu^{2+} \rightleftharpoons Zn^{2+} + Cu$$

可以分为半反应:



$$Zn \longrightarrow Zn^{2+} + 2e^- \qquad (氧化反应)$$



$$Cu^{2+} + 2e^- \longrightarrow Cu \qquad (还原反应)$$

两个半反应可组装成一个电化学池(图12.11)。电子可经连接两个半电池的导线由 Zn/Zn^{2+} 半电池流到另一个 Cu^{2+}/Cu 半电池,在该半电池中发生还原反应,使 Cu^{2+} 还原为金属铜。如果在电路中连接一伏特计,可以测量电势差,也称为还原电位(reduction potential)。

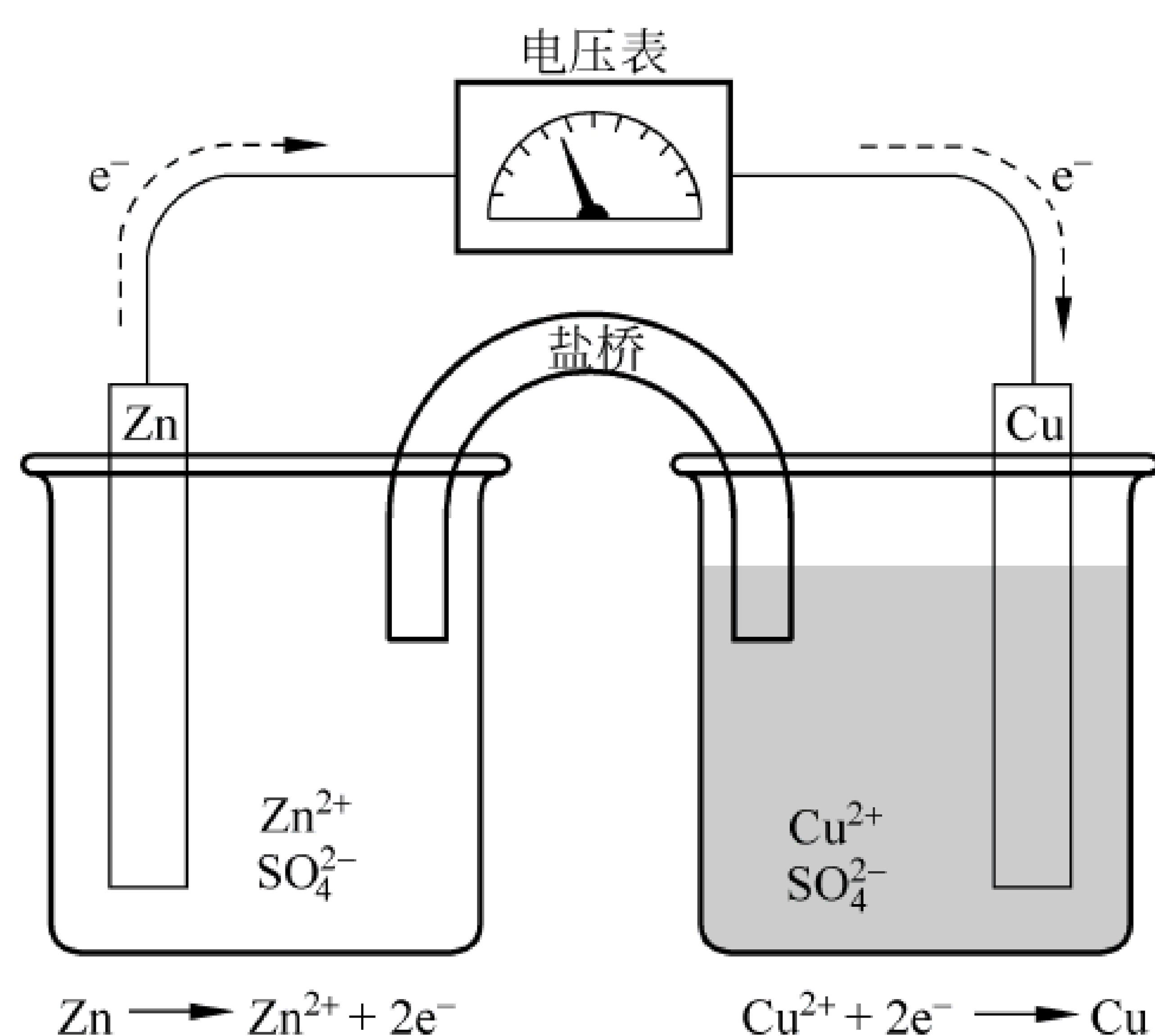


图12.11 电化学装置示意图

在阴极,参与反应的每个锌原子(还原剂)给出两个电子,电子流沿着导线流向阳极,在阳极 Cu^{2+} 接收电子被还原为金属铜。图中的盐桥是由充满电解液的多孔隔膜填充的管子构成的,其作用是通过转移离子来维持两个半反应池的电中性

测量还原电位需要参考标准。选择的参考半反应是氢气(H_2)的氧化,在标准条件下它的还原电位($E^{\ominus}$)人为地设定为0.0V。通常参考半反应池含有1mol/L H^+ 和1atm的 H_2,

而样品半反应池中含有待测样品的氧化态和还原态各1mol/L，运用氧化还原偶联就可以测定一个给定半反应的标准还原电位 $E^{\ominus}$。因为参考半反应的标准还原电位是0.0V，所以测得的还原电位就是样品半反应的标准还原电位 $E^{\ominus}$。

在生物测量的标准条件下，样品半反应池中氢离子浓度为 10^{-7} mol/L（pH7.0）。生物化学家规定pH7.0为氧化还原反应的标准态，还原电位表示为 $E^{\ominus\prime}$，也就是pH7.0时的标准还原电位。表12.2给出了一些重要的生物半反应在pH7.0的标准还原电位 $E^{\ominus\prime}$。电位值越负，这样的反应系统给出电子的倾向越大，因此，电子流会自动地由较负的还原电位流向相对较正的还原电位。

表12.2　生物化学中一些重要半反应的标准还原电位

半　反　应	$E^{\ominus\prime}/v$
乙酰CoA＋CO_2＋H^+＋$2e^-$ ⟶ 丙酮酸＋CoA	－0.48
铁氧还蛋白（菠菜），Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	－0.43
$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ H_2	－0.42
α-酮戊二酸＋CO_2＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 异柠檬酸	－0.38
硫辛酸脱氢酶（FAD）＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 硫辛酸脱氢酶（$FADH_2$）	－0.34
$NADP^+$＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ NADPH＋H^+	－0.32
NAD^+＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ NADH＋H^+	－0.32
硫辛酸＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 二氢硫辛酸	－0.29
硫氧还蛋白（氧化型）＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 硫氧还蛋白（还原型）	－0.28
谷胱甘肽（氧化型）＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 2谷胱甘肽（还原型）	－0.23
FAD＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ $FADH_2$	－0.22
FMN＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ $FMNH_2$	－0.22
乙醛＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 乙醇	－0.20
丙酮酸＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 乳酸	－0.18
草酰乙酸＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 苹果酸	－0.17
细胞色素 b_5（微体），Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.02
延胡索酸＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ 琥珀酸	0.03
辅酶Q（Q）＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ QH_2	0.04
细胞色素 b（线粒体），Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.08
细胞色素 c_1，Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.22
细胞色素 c，Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.23
细胞色素 a，Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.29
细胞色素 f，Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.36
质体蓝素，Cu^{2+}＋e^- ⟶ Cu^+	0.37
NO_3^-＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ NO_2^-＋H_2O	0.42
细胞色素 a_3，Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.55
光合作用系统Ⅰ（P700）	0.43
Fe^{3+}＋e^- ⟶ Fe^{2+}	0.77
$\frac{1}{2}O_2$＋$2H^+$＋$2e^-$ ⟶ H_2O	0.82
光合作用系统Ⅱ（P680）	1.1

电子从一个分子转移到另一分子的标准还原电位差与该氧化还原反应的标准自由能变化 $\Delta G^{\ominus\prime}$存在如下关系(称为Nernst方程):



$$\Delta G^{\ominus\prime}=-nF\Delta E^{\ominus\prime}$$

式中,n 为转移的电子数;F 为法拉第常数[96.485kJ/(V·mol)]。$\Delta E^{\ominus\prime}$被定义为电子受体系统与电子供体系统之间的还原电位差:

$$\Delta E^{\ominus\prime}=E^{\ominus\prime}_{电子受体}-E^{\ominus\prime}_{电子供体}$$

由于 $\Delta G^{\ominus\prime}=-RT\ln K_{eq}$,所以 $\Delta E^{\ominus\prime}$与氧化还原反应 K_{eq}的关系可表示如下:

$$\Delta E^{\ominus\prime}=(RT/nF)\ln K_{eq}$$

在生物条件下,系统中的反应物不是以标准浓度1mol/L存在的。Nernst方程给出了实际还原电位差(ΔE)与标准还原电位差($\Delta E^{\ominus}$)关系。对于如下氧化还原反应(下标red表示还原态,ox表示氧化态):

$$A_{red}+B_{ox}=A_{ox}+B_{red}$$

Nernst方程可表示为:

$$\Delta E=\Delta E^{\ominus\prime}-(RT/nF)\ln\{([A_{ox}][B_{red}])/([A_{red}][B_{ox}])\}$$

利用Nernst方程和代入反应物和产物的实际浓度,就可以计算非标准条件下反应的电位差(电动力)。但要记住:对于一个 $\Delta G^{\ominus\prime}$为负值的自发反应,$\Delta E^{\ominus\prime}$一定为正值。

12.6.2 NADH 氧化与 ATP 合成

在电子由代谢物转移给 NAD^+ 的偶联反应中,NAD^+ 被还原为NADH。生成的还原型辅酶NADH在另一个氧化还原反应中变成了一个电子源。以在膜结合的电子传递过程中NADH被氧化和分子氧被还原的反应为例,NADH的电子转移提供 $\Delta G^{\ominus\prime}$,该 $\Delta G^{\ominus\prime}$就是一种以ATP合成形式重新出现的可利用自由能。在标准条件下氧化还原总反应的自由能变化可以由两个半反应的标准还原电位通过公式 $\Delta G^{\ominus\prime}=-nF\Delta E^{\ominus\prime}$计算。

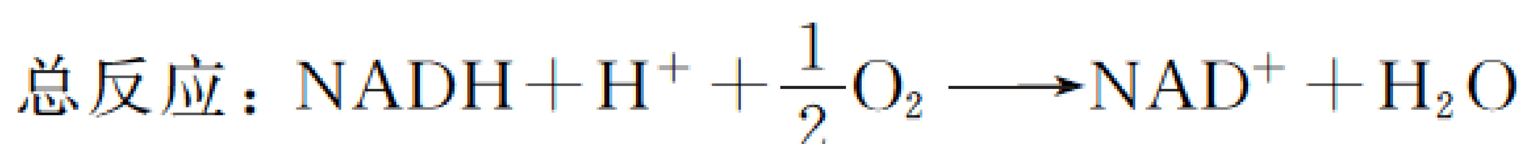
表12.2给出的两个半反应以及还原电位如下:



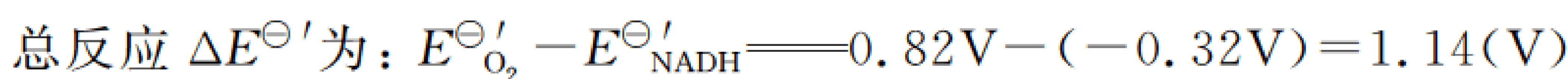
$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH + H^+ \qquad E^{\ominus\prime}=-0.32V$$



$$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2O \qquad E^{\ominus\prime}=0.82V$$



总反应:$NADH + H^+ + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O$



总反应 $\Delta E^{\ominus\prime}$为:$E^{\ominus\prime}_{O_2}-E^{\ominus\prime}_{NADH}=0.82V-(-0.32V)=1.14(V)$

由此可以计算出标准自由能变化:

$$\Delta G^{\ominus\prime}=-2\times[96.48kJ/(V\cdot mol)]\times1.14V=-220(kJ/mol)$$

由 $ADP+P_i$生成ATP的自由能变化是+30.5kJ/mol,所以在细胞条件下,NADH氧化释放出的能量足可以驱动数个ATP分子的形成。

小结

1. 活细胞中进行的化学反应总称为代谢,系列反应构成代谢途径。降解(分解代谢)和合成(合成代谢)途径都是按照分开的步骤进行的。

2. 在多细胞生物中，代谢任务一般都是在不同组织和不同的细胞区域进行的，称为代谢途径的区室化。器官间的代谢通过激素协调。

3. 代谢途径受到调节以便有机体能有效地利用燃料和响应需求的变化。个别的关键酶通常都受到别构修饰或可逆的共价修饰调控。

4. 主要的分解代谢途径可以将大分子转化为小的产能代谢物。分解代谢反应中释放的能量以 ATP、GTP 和还原型辅酶形式被保存。

5. 化学或酶促反应的方向取决于自由能的变化，只有当自由能变化为负值时反应才能自发进行。反应的标准自由能的变化与该反应的平衡常数有关，$\Delta G^{\ominus\prime}=-RT\ln K_{eq}$。

6. ATP 的磷酸酐基团水解可释放大量自由能。可以利用末端磷酰基团或腺苷酰基转移时产生的 ATP 能量。一些带有高的磷酰基团转移势能的代谢物能够将它们的磷酰基团转移给 ADP 生成 ATP。

7. 像酰基辅酶 A 那样的硫酯可以贡献出酰基，而且有时也可以产生 ATP 当量。

8. 生物氧化反应的自由能可以以还原型辅酶形式保存。这种形式的能量是以还原电位差测量的，还原电位表示一个分子给出电子的能力，标准的还原电位与标准的自由能变化有关，$\Delta G^{\ominus\prime}=-nF\Delta E^{\ominus\prime}$。

习题

1. 一个生物合成途径由化合物 A(经 B、C、D)到化合物 E 进行了 4 步反应，然后分支。一个分支是一个两步(经 F)到 G 途径，另一个分支是三步(经 H、I)到 J 途径。底物 A 是催化 E 合成的一个前馈激活剂。产物 G 和 J 是共同途径中第一个酶的反馈抑制剂，而且它们也抑制分支点后它们自己途径中的第一个酶。

(a) 画一个表示这个代谢途径的调节图。

(b) 两个产物的每一个都抑制途径中的两个酶，有什么优越性？

2. 葡萄糖经糖酵解和柠檬酸循环两个途径组合可以完成降解。糖酵解酶位于胞质，而柠檬酸循环酶处于线粒体。两个途径的酶分别处于不同细胞区室有哪两点优越性？

3. 某反应 A $\longrightarrow$ B，$\Delta G^{\ominus\prime}=20$kJ/mol。反应物和生成物的比例至少要达到多少，才能使 A $\longrightarrow$ B 反应顺利进行？

4. (a)一分子 ATP 通常在合成后一分钟就被消耗了，一个成年人平均每天需要约 65kgATP。但人体含有的 ATP 和 ADP 量总计约 50g，可利用的 ATP 怎么可能会有那么多？(b)ATP 有储存能量的作用吗？

5. 当 pH 从 5 增加到 6 时，ATP 水解的自由能值是增加了还是降低了？

6. 一个脂肪酸($RCOO^-$)的活化反应为 ATP＋CoA＋$RCOO^-$ $\longleftrightarrow$ RCO-CoA＋AMP＋PP_i，反应的 $\Delta G^{\ominus\prime}=+4.65$kJ/mol。是什么样热力学驱动力使该反应进行？

7. 解释为什么磷酸肌酸起着 ATP“缓冲剂”的作用？

8. pH 值为 0 时，$\frac{1}{2}O_2+2H^++2e^-\longrightarrow H_2O \qquad E^{\ominus\prime}=1.23V$

该氧化还原反应在 pH 为 0，还是 pH 为 7 的条件下更容易发生？利用电化学和化学平衡原理解释。

9. 一个假设的三步代谢途径由中间物 W、X、Y 和 Z 及酶 A、B 和 C 组成。根据以下信息推测该途径中酶反应步骤的顺序：

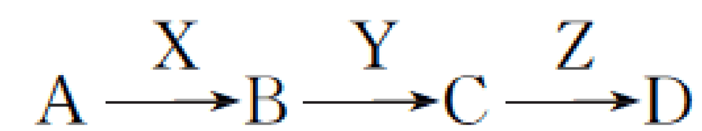
a. 酶 B 的一个代谢抑制剂化合物 Q 引起 Z 积累。

b. 酶 C 催化反应的产物为 Y。

c. 酶 A 的一个抑制剂使 W、Y 和 Z 积累。

d. 酶 C 的一个代谢抑制剂化合物 P 使 W 和 Z 积累。

10. 某一代谢途径可以表示如下：



其中 A、B、C 和 D 是中间物，X、Y 和 Z 是催化反应的酶。生理条件下 3 个酶催化反应的自由能变化：X(－0.2kJ/mol)，Y(－12.3kJ/mol)，Z(－1.2kJ/mol)。

(a) 哪个反应有可能是该途径中的主要调控点？

(b) 如果你(a)答案遇到以下情况：有抑制酶 Z 活性的抑制剂存在下，A、B、C 和 D 的浓度将增加、减少还是不受影响？

13　糖酵解与戊糖磷酸途径

葡萄糖是个六碳醛糖，虽然是个部分还原的分子，但含有丰富能量，是大部分有机体的主要燃料分子。葡萄糖在代谢中既可以作为构件分子聚合为储能大分子淀粉或糖原，也可以被彻底氧化为二氧化碳和水，提供代谢所需的大量能量。此外，葡萄糖还可作为代谢中间物，用作氨基酸、核苷酸、辅酶和脂肪酸等生物分子的碳骨架。

本章主要阐述葡萄糖的分解代谢：糖酵解和作为糖酵解一个支路的戊糖磷酸途径。

13.1　糖酵解

人们在无氧条件下利用酵母菌发酵葡萄糖酿酒虽然已有悠久的历史，但整个酿酒过程，包括反应中涉及的酶、中间代谢物和辅酶等直到1940年才被阐明。由糖发酵酿造酒的主要途径是称为糖酵解(glycolysis)[源于希腊语glykys(糖)和lysis(裂开)组合]的糖降解途径。糖酵解是通过一系列酶促反应将葡萄糖降解为丙酮酸并伴有ATP生成的过程，是动物、植物及微生物细胞中葡萄糖降解产能的共同代谢途径。事实上，在所有的细胞中都存在着糖酵解途径，对于某些细胞，例如红细胞，糖酵解还是惟一生成ATP的途径。

糖酵解途径涉及10个酶催化反应，这些酶都位于胞质溶胶中，1分子葡萄糖通过该途径被转换成2分子丙酮酸(图13.1)。

13.1.1　糖酵解反应

从图13.1看到，糖酵解的10个反应被分为两个阶段，第1阶段(也称为己糖阶段)由①～⑤5步反应组成，1分子葡萄糖被转换为2分子甘油醛-3-磷酸，投入能量ATP；第2阶段(也称为丙糖阶段)由⑥～⑩5步反应构成，2分子的甘油醛-3-磷酸被转换为2分子丙酮酸，回收ATP。在第1阶段消耗了2分子ATP，而在第2阶段收获了4分子ATP，所以1分子葡萄糖通过糖酵解转换为2分子丙酮酸过程中净生成了2分子ATP。

图13.1给出的糖酵解途径是一个概括图，下面按照图中的反应序号依次对每一步反应进行详细的描述。

① 葡萄糖磷酸化形成葡糖-6-磷酸，投入第1个ATP

反应由己糖激酶(hexokinase)催化，葡萄糖的C-6磷酸化形成葡糖-6-磷酸，酶催化反应需要Mg^{2+}参与，同时消耗1分子ATP(图13.2)。磷酸化葡萄糖因为含有带负电荷的磷酰基，被限制在细胞内，防止糖分子再次通过质膜，这是细胞的一种保糖机制。

葡萄糖
ATP
ADP
己糖激酶
葡糖激酶
①
葡糖-6-磷酸
葡糖-6-磷酸
异构酶
②
果糖-6-磷酸
ATP
ADP
磷酸果糖
激酶-1
③
果糖-1,6-二磷酸
醛缩酶
④
⑤
丙糖磷酸异构酶
磷酸二羟丙酮
甘油醛-3-磷酸

第1阶段
1分子葡萄糖
转换为2分子
甘油醛-3-磷酸
投入2分子ATP

甘油醛-3-磷酸
脱氢酶
$NAD^+ + P_i$
$NADH + H^+$
⑥
1,3-二磷酸甘油酸
磷酸甘油酸
激酶
ADP
ATP
⑦
3-磷酸甘油酸
磷酸甘油酸
变位酶
⑧
2-磷酸甘油酸
烯醇化酶
H_2O
⑨
磷酸烯醇式丙酮酸
丙酮酸激酶
ADP
ATP
⑩
丙酮酸

×2
第2阶段
2分子甘油醛-3-磷酸
转换为2分子丙酮酸,
生产出4分子ATP

图 13.1 葡萄糖糖酵解过程

其中有些反应是可逆的

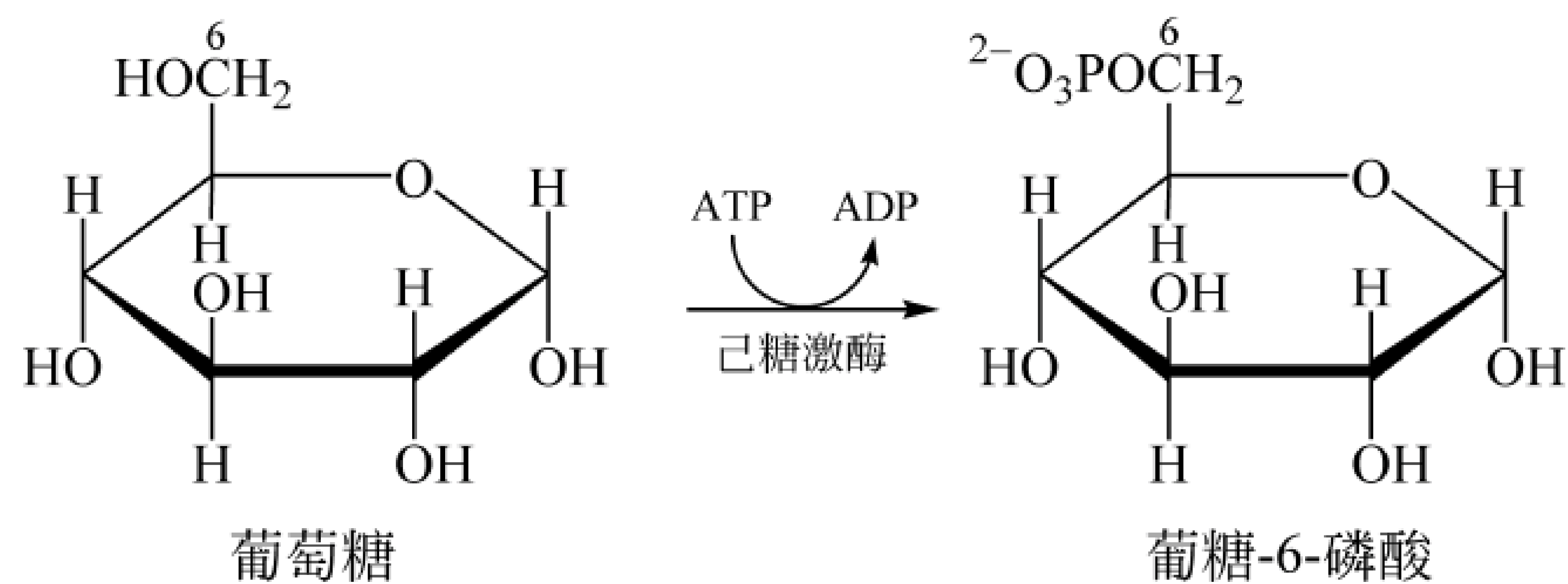


图 13.2 己糖激酶反应

己糖激酶以六碳糖为底物，专一性不强。不同的细胞内存在着不同形式的己糖激酶的同工酶，它们对葡萄糖的 K_m 值不同。除了葡萄糖，己糖激酶还可催化甘露糖、果糖等己糖的磷酸化。另外，己糖激酶的同工酶葡糖激酶(glucokinase)也可催化葡萄糖的磷酸化反应，但它与己糖激酶对葡萄糖的 K_m 不同，己糖激酶对 *D*-葡萄糖的 K_m 为 0.1mmol/L，而肝葡糖激酶的 K_m 为 10mmol/L。平时细胞内葡萄糖浓度为 5mmol/L，此时己糖激酶的酶促反应已达最大速度，而葡糖激酶并不活跃，只有在进食后，肝细胞内葡萄糖浓度高时，葡糖激酶才起作用，所以葡糖激酶是个诱导酶。

② 葡糖-6-磷酸转化为果糖-6-磷酸

在葡糖-6-磷酸异构酶(glucose-6-phosphate isomerase)催化下，葡糖-6-磷酸异构化生成果糖-6-磷酸，这是一个醛糖-酮糖同分异构化反应，反应是可逆的(图 13.3)。葡糖-6-磷酸的 α-异头物首先与葡糖-6-磷酸异构酶结合，在酶的活性部位形成开链式的葡糖-6-磷酸，然后进行醛糖-酮糖转换，葡糖-6-磷酸的醛基还原为羟基，而 C-2 的羟基氧化为羰基，开链式的果糖-6-磷酸再环化形成 α-*D*-呋喃果糖-6-磷酸。葡糖-6-磷酸异构酶表现出绝对的立体专一性。当反应向相反方向进行时，果糖-6-磷酸(分子中 C-2 不是手性 C)只转换成葡糖-6-磷酸，而不会生成葡糖-6-磷酸的 C-2 差向异构体甘露糖-6-磷酸。

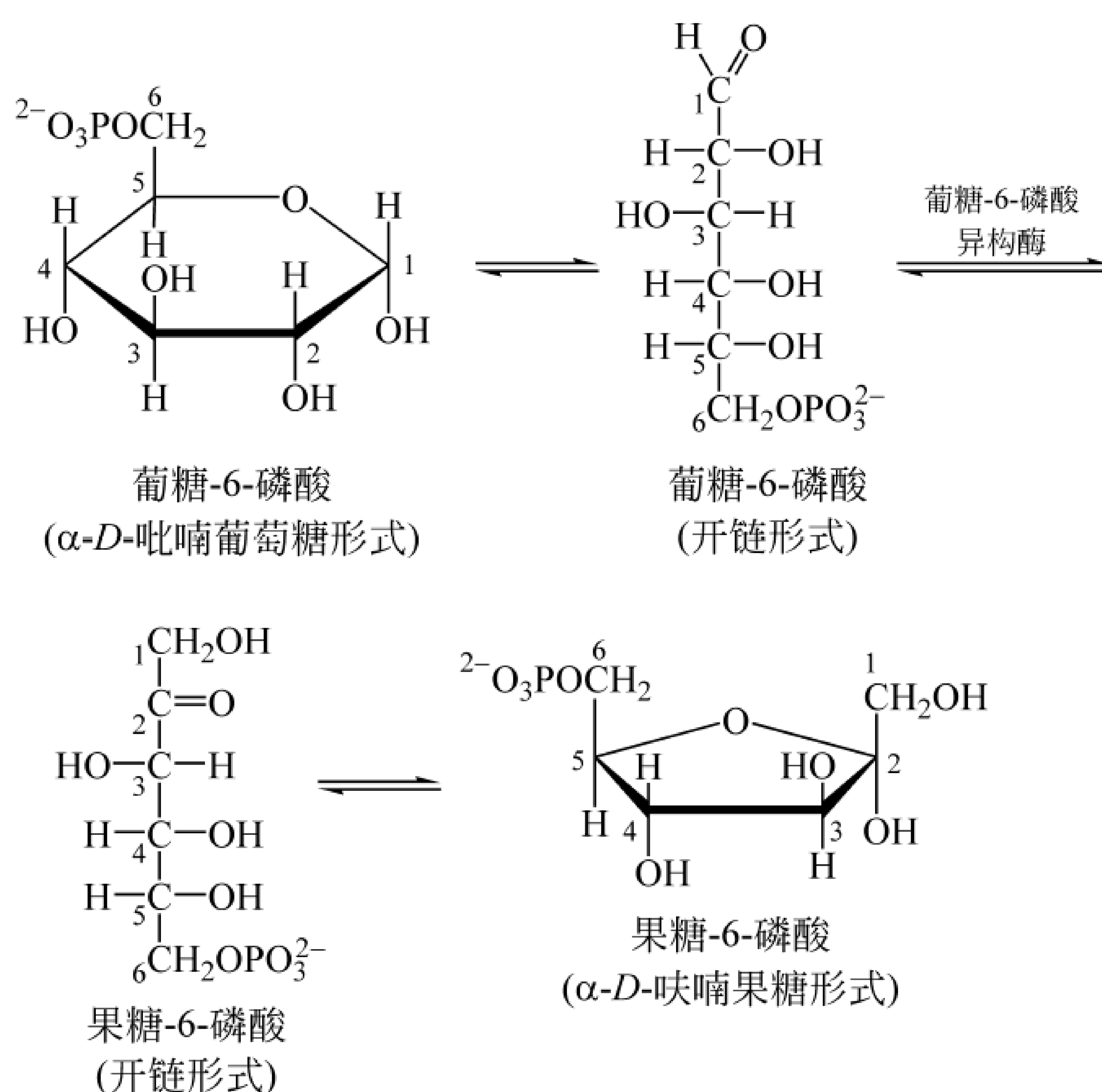


图 13.3 葡糖-6-磷酸异构酶反应

③ 果糖-6-磷酸磷酸化生成果糖-1,6-二磷酸，投入第 2 个 ATP

反应由磷酸果糖激酶-1(phosphofructokinase-1，PFK-1)催化，ATP 中的磷酸基团转移到果糖-6-磷酸的 C-1 上，生成果糖-1,6-二磷酸(图 13.4)。要注意的是，尽管葡糖-6-磷酸异构酶催化反应生成的产物是 α-*D*-果糖-6-磷酸，但 PFK-1 的底物却是 β-*D*-果糖-6-磷酸，不过果糖-6-磷酸的 α 和 β 异头物在水溶液中是处于非酶催化的快速平衡中。

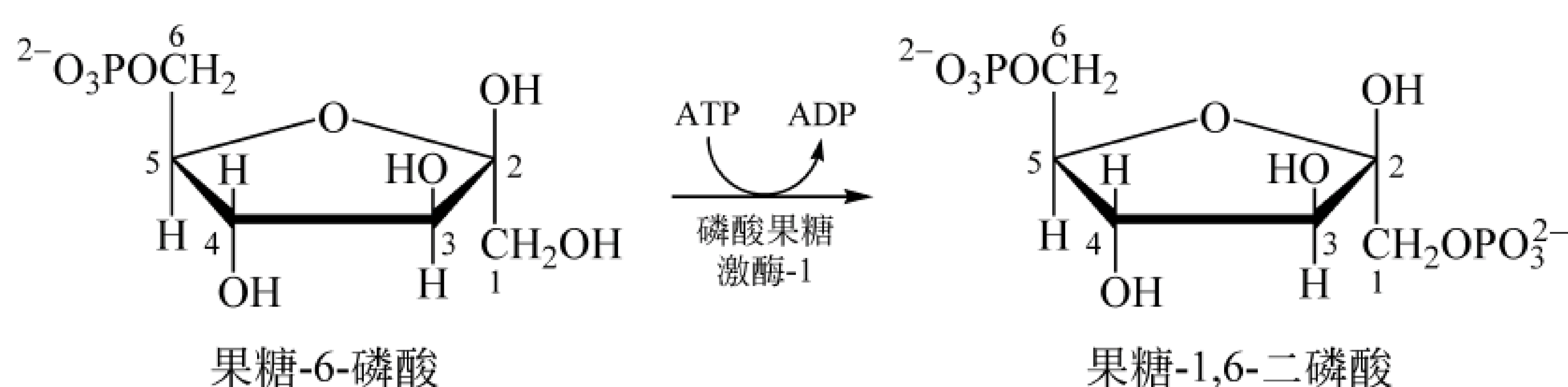


图 13.4　磷酸果糖激酶-1 反应

④ 果糖-1,6-二磷酸裂解生成甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮

在醛缩酶(aldolase)催化下,果糖-1,6-二磷酸的 C-3 和 C-4 之间的键断裂,生成磷酸二羟丙酮和甘油醛-3-磷酸(图 13.5)。甘油醛-3-磷酸可直接进行下一步糖酵解反应,而磷酸二羟丙酮则需要通过酶促反应转换成甘油醛-3-磷酸后进入糖酵解途径。另外,磷酸二羟丙酮还可用于合成甘油-3-磷酸(见第 18 章脂代谢)。

⑤ 磷酸二羟丙酮转化为甘油醛-3-磷酸

在丙糖磷酸异构酶(triose phosphate isomerase)催化下磷酸二羟丙酮转化为甘油醛-3-磷酸,这也是个醛糖-酮糖同分异构化反应,反应是可逆的(图 13.6)。

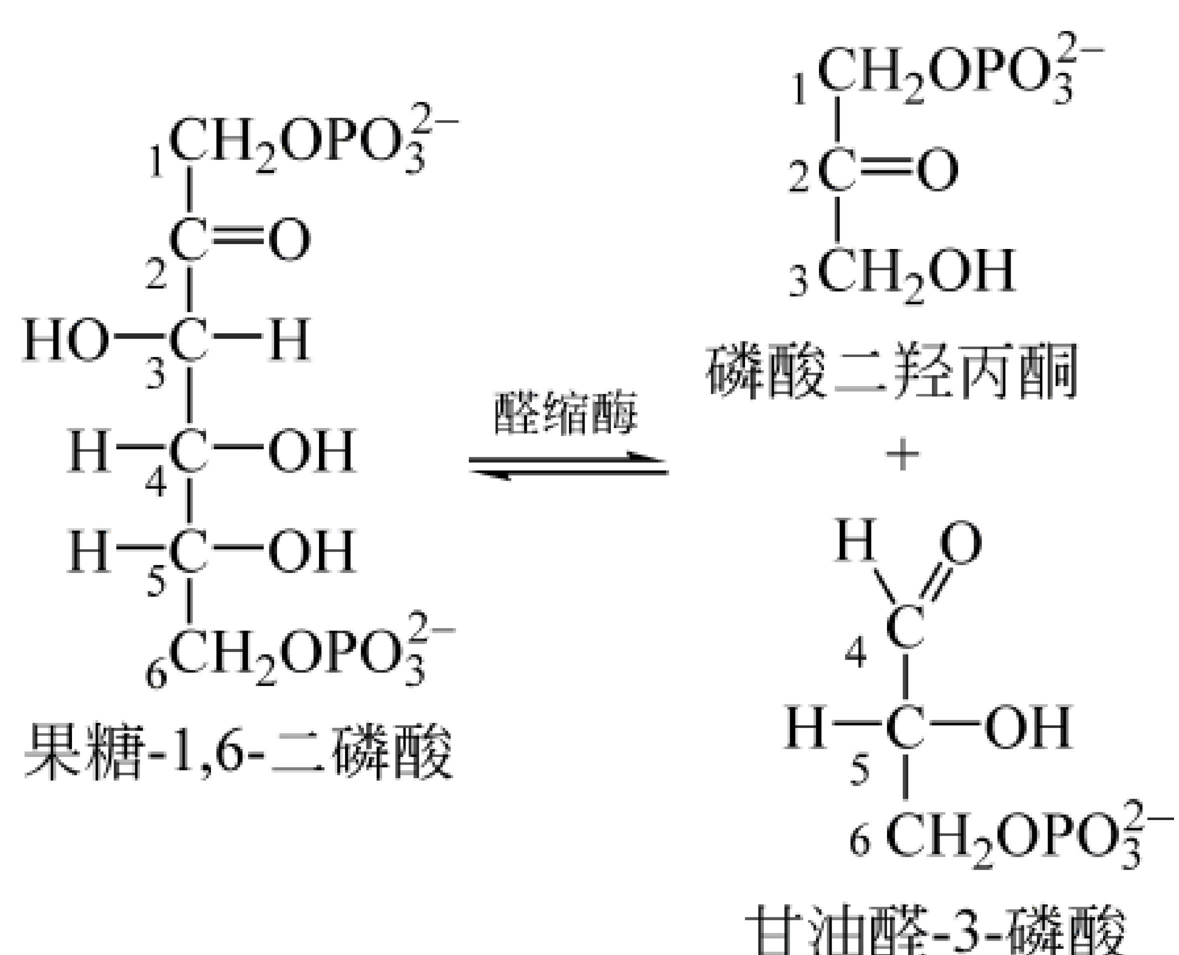


图 13.5　醛缩酶反应

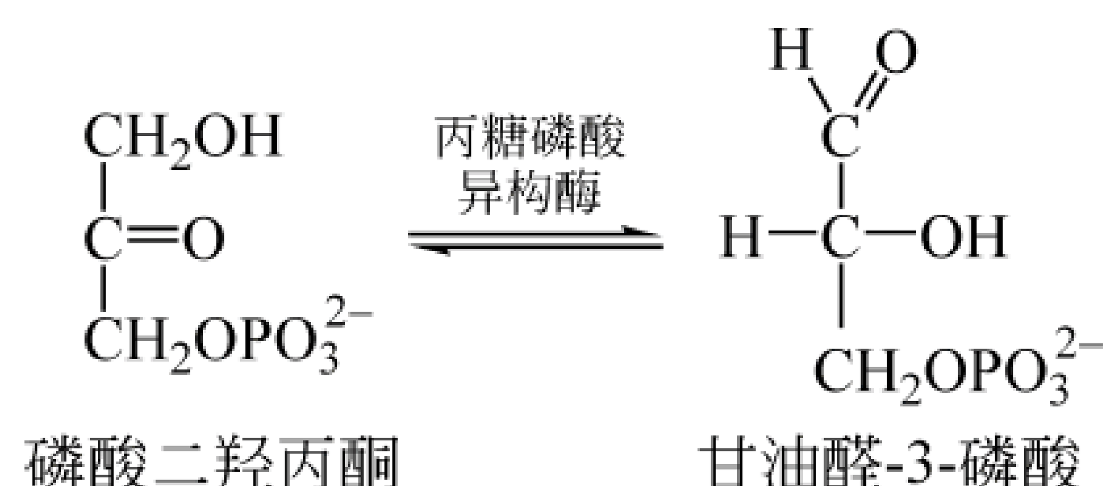


图 13.6　丙糖磷酸异构酶反应

糖酵解进行到这一步,1 分子葡萄糖被裂解成 2 分子甘油醛-3-磷酸。通过放射性核素追踪实验发现,1 分子甘油醛-3-磷酸中的 C-1、C-2 和 C-3 分别来自于葡萄糖分子中的 C-4、C-5 和 C-6,而另 1 分子的甘油醛-3-磷酸(由磷酸二羟丙酮转换来的)的 C-1、C-2 和 C-3 则分别来自于葡萄糖分子中的 C-3、C-2 和 C-1(图 13.7),就是说,葡萄糖分子中的 C-4 和 C-3 转换成了甘油醛-3-磷酸的 C-1;而 C-5 和 C-2 变成了甘油醛-3-磷酸的 C-2;葡萄糖分子中的 C-6 和 C-1 变成了甘油醛-3-磷酸的 C-3。

⑥ 甘油醛-3-磷酸氧化为 1,3-二磷酸甘油酸

这是一步氧化还原反应,在甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)催化下,甘油醛-3-磷酸经氧化和磷酸化生成 1,3-二磷酸甘油酸,NAD^+ 为辅酶,有些生物用 $NADP^+$ 作为辅酶(图 13.8)。

甘油醛-3-磷酸醛基氧化释放出很大的负自由能变化:其中一些能量被保存在 1,3-二磷酸甘油酸的酸酐键中,在下一步反应中 1,3-二磷酸甘油酸的磷酰基转移给 ADP 形成 ATP;

其余能量以还原当量形式(NADH)保存,一分子 NADH 等于几分子 ATP。因此,这步反应是整个糖酵解中的主要产能反应。

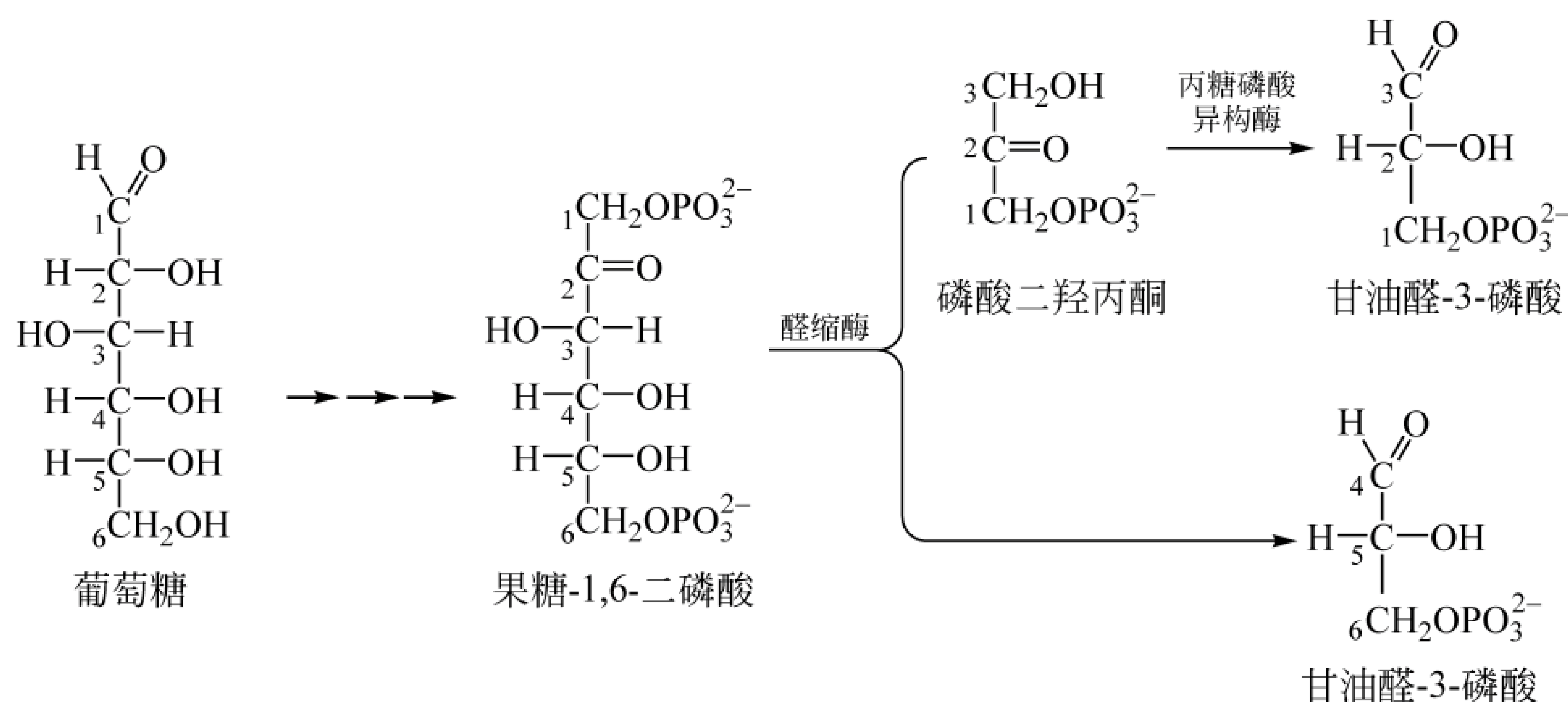


图 13.7　六碳糖转换成三碳糖后碳原子的归属

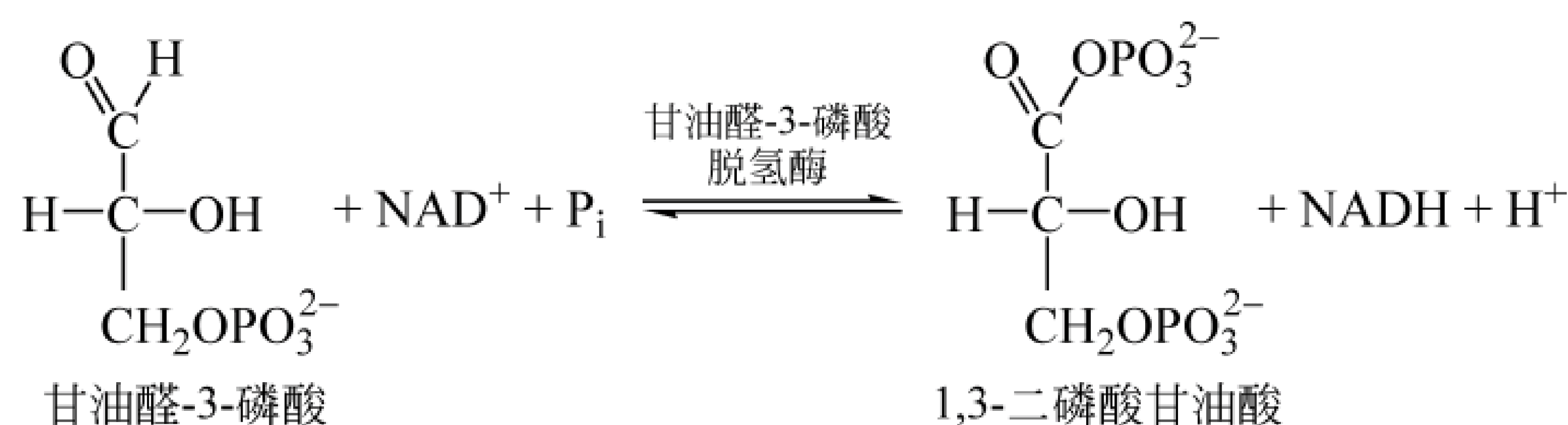


图 13.8　甘油醛-3-磷酸脱氢酶反应

要注意,虽然给出的是 1 分子甘油醛-3-磷酸氧化为 1 分子 1,3-二磷酸甘油酸,但实际上有 2 分子甘油醛-3-磷酸(另 1 分子甘油醛-3-磷酸来自磷酸二羟丙酮)参加反应,所以应有 2 分子 1,3-二磷酸甘油酸生成。以此类推,以下反应都应当是 2 分子反应物和 2 分子产物。

砷和磷都属于元素周期表中第Ⅴ族元素,砷酸盐(AsO_4^{-3})在结构和反应性方面都与磷酸盐相似。无机砷酸可以取代无机磷酸作为甘油醛-3-磷酸脱氢酶的底物,所以砷酸与磷酸竞争甘油醛-3-磷酸脱氢酶的底物结合部位,会生成一个不稳定的、类似于 1,3-二磷酸甘油酸的 1-砷酸-3-磷酸甘油酸。然而该化合物一接触到水会自动水解,生成 3-磷酸甘油酸和无机砷酸,这是个非酶催化过程(图 13.9)。

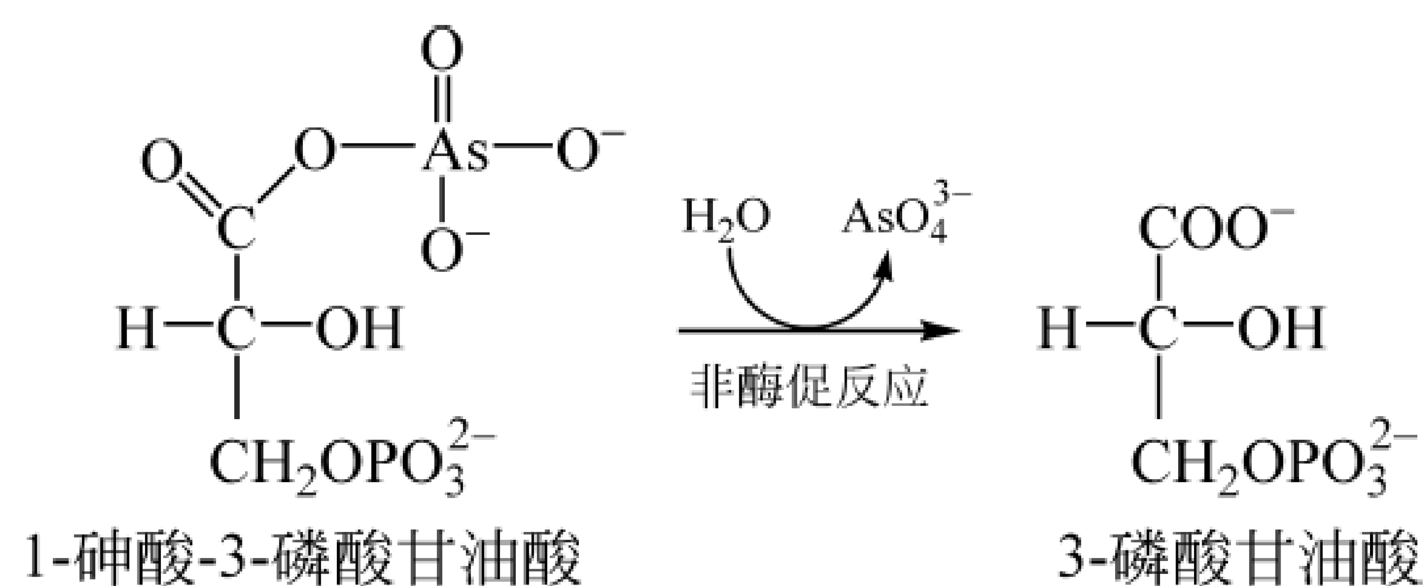
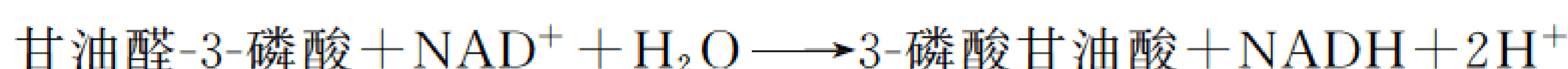


图 13.9　1-砷酸-3-磷酸甘油酸自动水解

在砷酸存在下,糖酵解可以从 3-磷酸甘油酸开始,但 1,3-二磷酸甘油酸可产生 ATP 的反应被破坏了,使糖酵解中没有净的 ATP 生成,所以砷酸参与的反应是个潜在的致死反

应。在砷酸存在下,反应变成了:



$$甘油醛\text{-}3\text{-}磷酸 + NAD^+ + H_2O \longrightarrow 3\text{-}磷酸甘油酸 + NADH + 2H^+$$

⑦ 1,3-二磷酸甘油酸转变为 3-磷酸甘油酸,同时生成 ATP

在磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)催化下,磷酰基从富含能量的酸酐 1,3-二磷酸甘油酸转给 ADP,生成 ATP 和 3-磷酸甘油酸(图 13.10)。

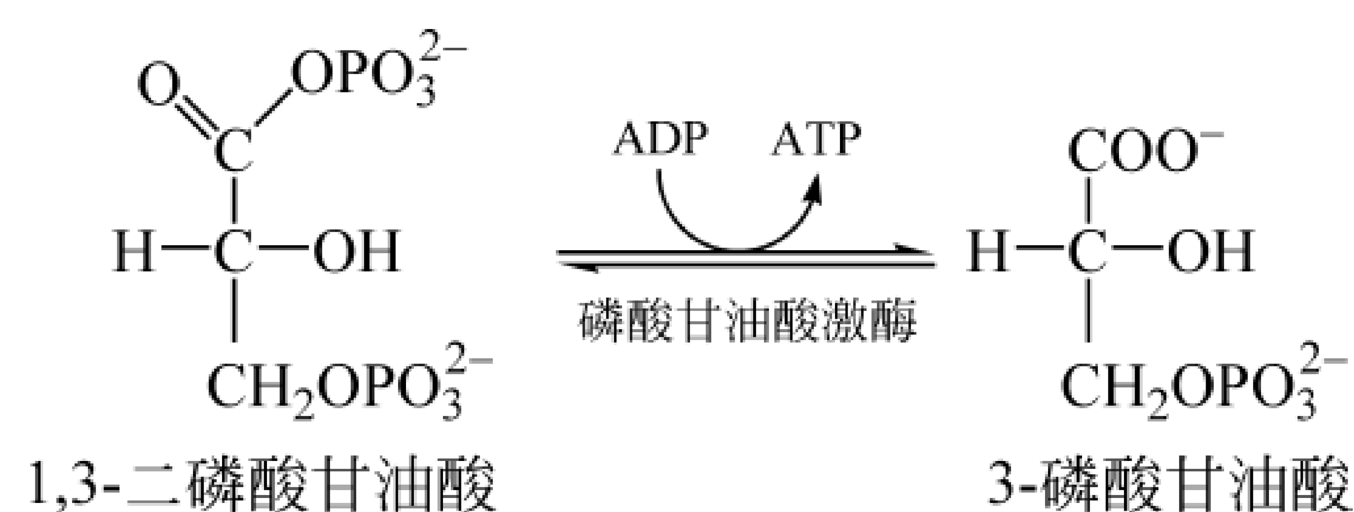


图 13.10 磷酸甘油酸激酶反应

从一个高能化合物(例如 1,3-二磷酸甘油酸)将磷酰基转移给 ADP 形成 ATP 的过程称为底物水平磷酸化(substrate-level phosphorylation)。这步反应是糖酵解中第 1 次产生 ATP 的反应,反应可逆。另外要注意,实际上是有 2 分子 1,3-二磷酸甘油酸参加反应,应有 2 分子 ATP 生成。前面由葡萄糖转换为 1,6-二磷酸果糖时投入了 2 分子 ATP,而在这一步反应中回收了 2 分子 ATP,投入 ATP 和产出 ATP 刚好平衡。

在红细胞中,1,3-二磷酸甘油酸除了转变为 3-磷酸甘油酸外,还可转换为 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-BPG)(图 13.11),这是红细胞中糖酵解的一个重要功能。2,3-BPG 是血红蛋白氧合作用的别构抑制剂。红细胞中的二磷酸甘油酸变位酶催化 1,3-二磷酸甘油酸中 C-1 的磷酰基转移到 C-2 上,形成 2,3-BPG。而 2,3-BPG 又可在 2,3-BPG 磷酸酶的催化下水解生成 3-磷酸甘油酸,重新进入糖酵解途径,转化为丙酮酸。

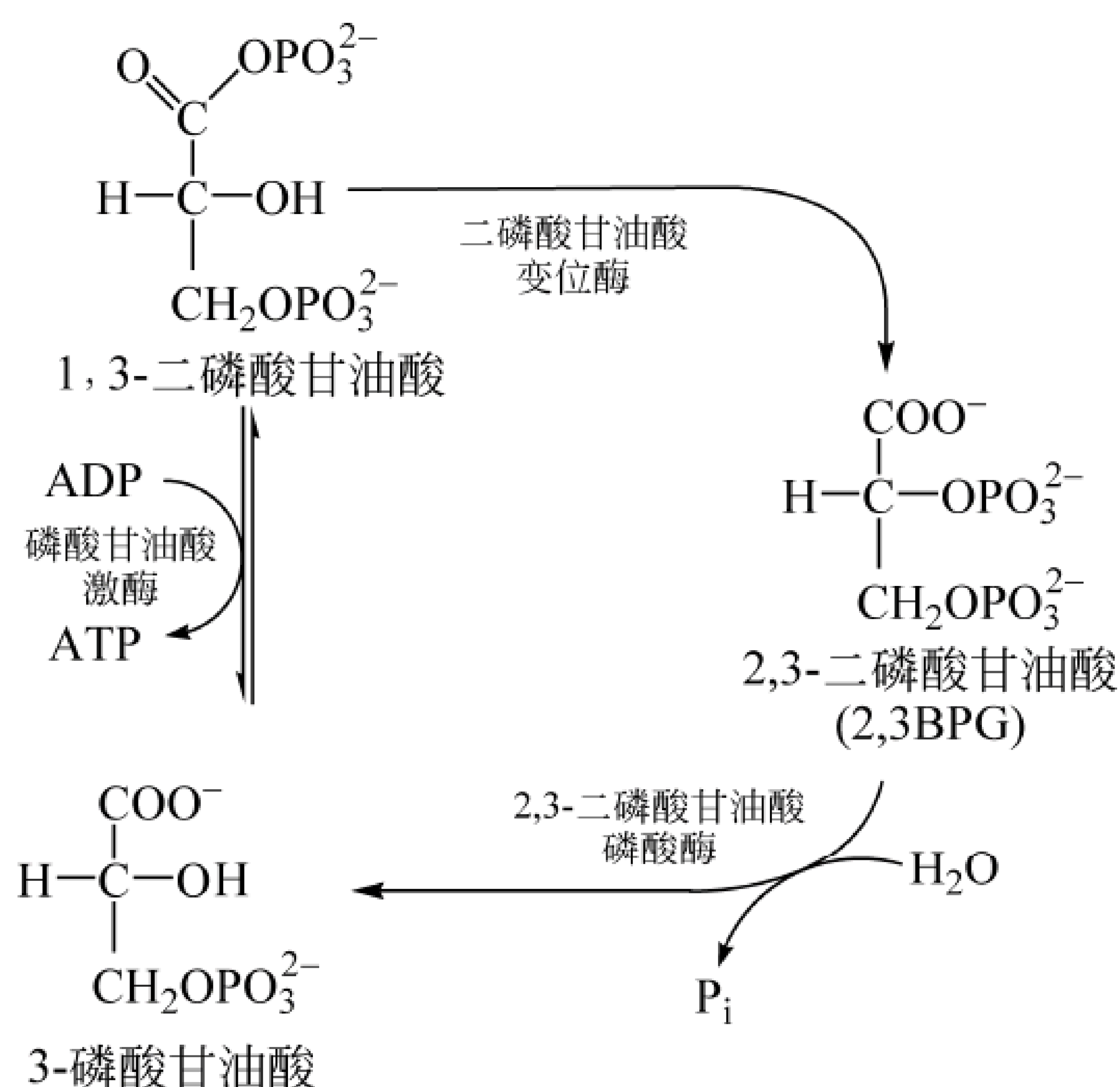


图 13.11 红细胞中 2,3-二磷酸甘油酸的形成和水解

⑧ 3-磷酸甘油酸转换为 2-磷酸甘油酸

在磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase)催化下,磷酸基团由 3-磷酸甘油酸的

C-3 位转移到 C-2，生成 2-磷酸甘油酸（图 13.12）。

⑨ 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸

在烯醇化酶（enolase）（需要 Mg^{2+} 做辅助因子）催化下，2-磷酸甘油酸中的 α，β 位脱去 1 分子水，分子内能量重新排布，转换为一个具有极高磷酰转移潜能的烯醇-磷酸酯磷酸烯醇式丙酮酸（图 13.13）。

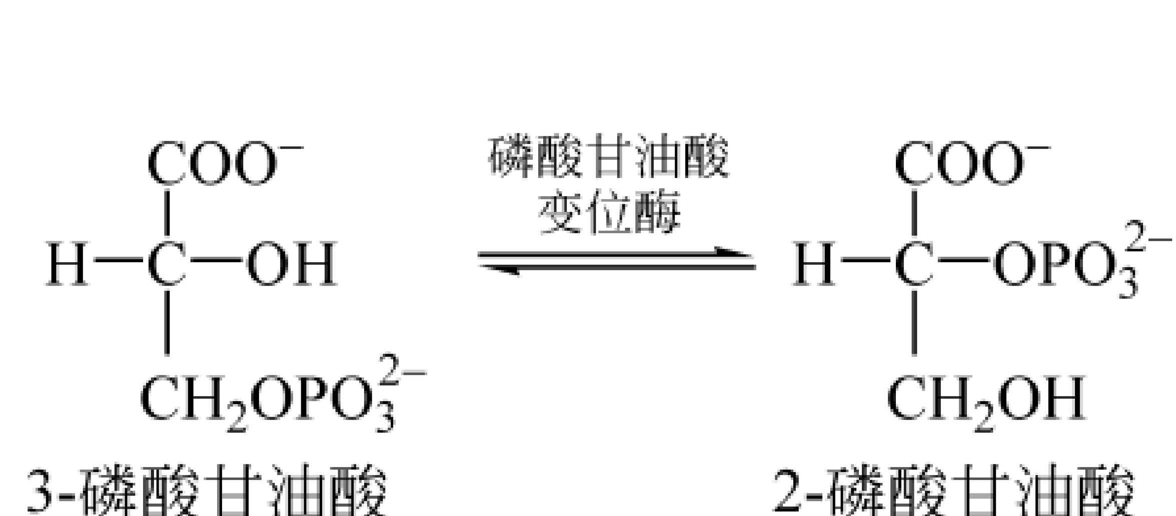


图 13.12　磷酸甘油酸变位酶反应

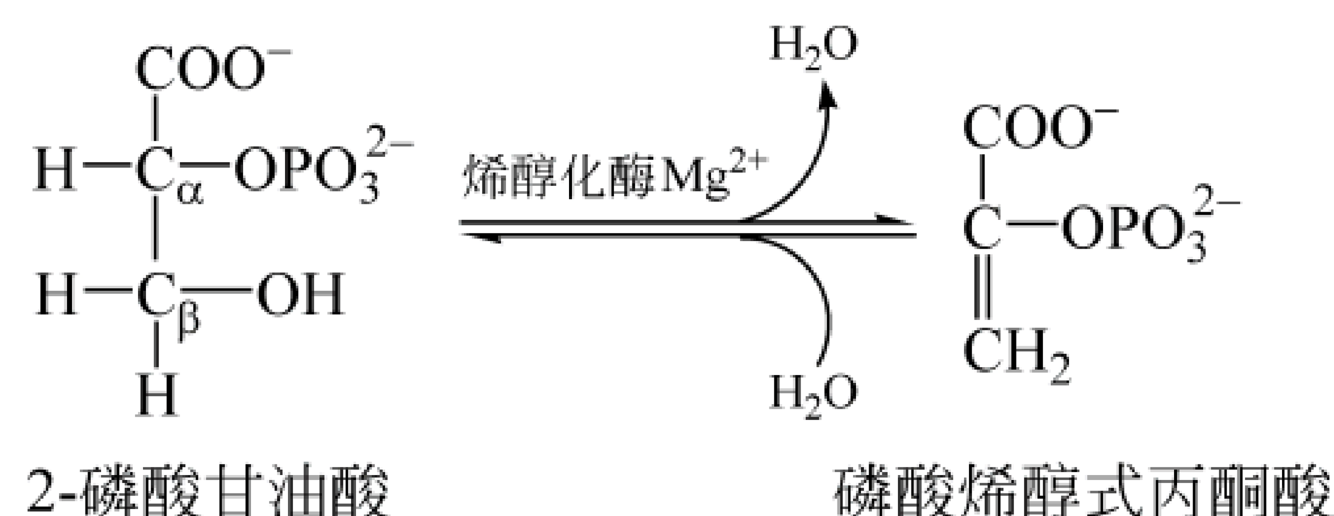


图 13.13　烯醇化酶反应

⑩ 磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸，并生成 ATP

这是糖酵解中第 2 个底物水平磷酸化反应，反应需要 K^+ 和 Mg^{2+} 作为辅助因子，在丙酮酸激酶（pyruvate kinase）催化下，磷酰基从磷酸烯醇式丙酮酸转移到 ADP 的 β-磷酸基团上，形成 ATP 和烯醇式丙酮酸，反应是不可逆的（图 13.14）。与酶结合的烯醇式丙酮酸异构化形成更稳定的丙酮酸。丙酮酸是糖酵解中第 1 个没有再被磷酸化的化合物。

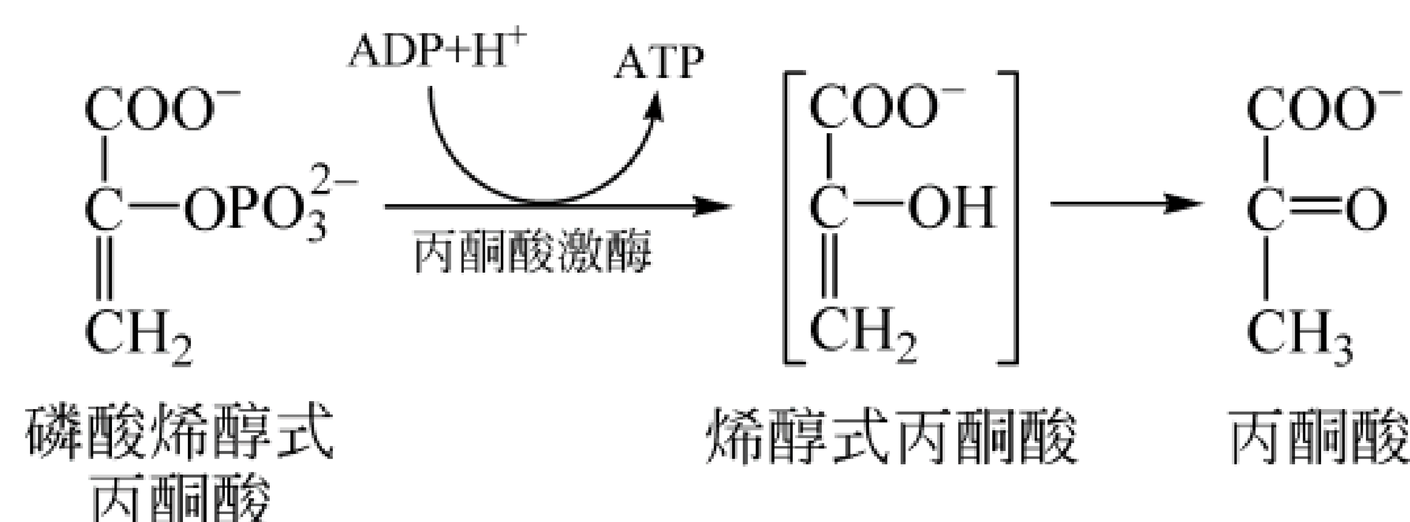
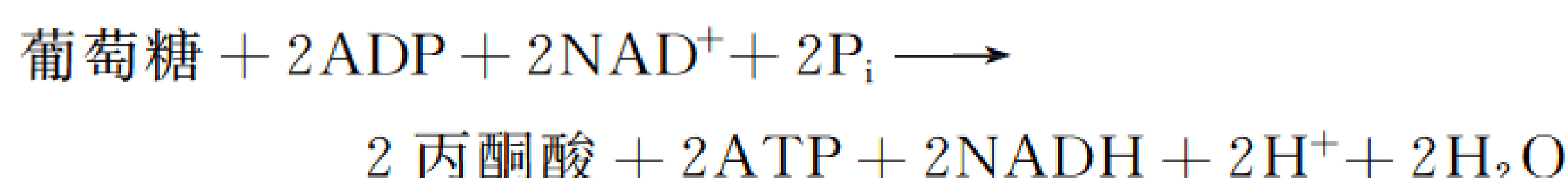


图 13.14　丙酮酸激酶反应

要注意这步反应实际上也是 2 分子的磷酸烯醇式丙酮酸参加反应，所以应有 2 分子的 ATP 生成。

至此，1 分子葡萄糖经糖酵解途径生成 2 分子丙酮酸的总反应可表示为：



$$\text{葡萄糖} + 2ADP + 2NAD^+ + 2P_i \longrightarrow 2\,\text{丙酮酸} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O$$

反应中净生成了 2 分子 ATP，此外还使得 2 分子的 NAD^+ 还原为 2 分子 NADH。

表 13.1 给出了糖酵解各步反应的标准自由能变化和实际自由能变化值。$\Delta G^{\ominus\prime}$ 值为标准自由能变化，是假设在 25℃ 和 37℃ 下都一样，于标准条件下的计算值（反应物和产物浓度都为 1mol/L，pH7.0）。ΔG 是反应的实际自由能变化，是由 $\Delta G^{\ominus\prime}$ 和在典型的生理条件下已知的反应物浓度计算得到的。

当糖酵解途径实际运行时，从葡萄糖开始代谢至丙酮酸，途径中的每一单个反应的实际自由能变化都应当为负值或为零。表 13.1 中几个反应的 ΔG 为很小的正值，近似为零值，这表明正在进行糖酵解的体内细胞中代谢物浓度的测量还不够精确。

表 13.1　糖酵解各步反应的自由能变化

	反　　应	$\Delta G^{\ominus\prime}$/(kJ/mol)	ΔG/(kJ/mol)
1	葡萄糖＋ATP ⟶ 葡糖-6-磷酸＋ADP	－16.7	－33.9
2	葡糖-6-磷酸 ⟷ 果糖-6-磷酸	＋1.7	－2.9
3	果糖-6-磷酸＋ATP ⟶ 果糖-1,6-二磷酸＋ADP	－14.2	－18.8
4	果糖-1,6-二磷酸 ⟷ 磷酸二羟丙酮＋甘油醛-3-磷酸	＋23.9	－0.2
5	磷酸二羟丙酮 ⟷ 甘油醛-3-磷酸	＋7.6	＋2.4
6	甘油醛-3-磷酸＋NAD^+＋P_i ⟷ 1,3-二磷酸甘油酸＋NADH＋H^+	＋6.2	－1.3
7	1,3-二磷酸甘油酸＋ADP ⟷ 3-磷酸甘油酸＋ATP	－18.8	＋0.1
8	3-磷酸甘油酸 ⟷ 2-磷酸甘油酸	＋4.4	＋0.8
9	2-磷酸甘油酸 ⟷ 磷酸烯醇式丙酮酸＋H_2O	＋1.8	＋1.1
10	磷酸烯醇式丙酮酸＋ADP ⟶ 丙酮酸＋ATP	－31.4	－23.0

13.1.2　丙酮酸的命运

在糖酵解过程中,葡萄糖转换为两分子丙酮酸,净合成了两分子 ATP。如果反应停止在丙酮酸,由于氧化还原平衡不能维持,糖酵解持续不了多久,很快就会终止。就像我们在上面所看到的那样,在甘油醛-3-磷酸脱氢酶反应中,除了生成具有高磷酰基转移势能的1,3-二磷酸甘油酸,还使 NAD^+ 被还原为 NADH。由于细胞内的 NAD^+ 量有限,因此为了使糖酵解能连续进行,NAD^+ 必须要由丙酮酸代谢再生。

能够通过丙酮酸代谢使得 NAD^+ 再生的反应主要有:无氧条件下丙酮酸转化为(1)乙醇或(2)乳酸,以及(3)有氧条件下丙酮酸转化为乙酰 CoA,乙酰 CoA 再进一步氧化为 CO_2(图 13.15)。

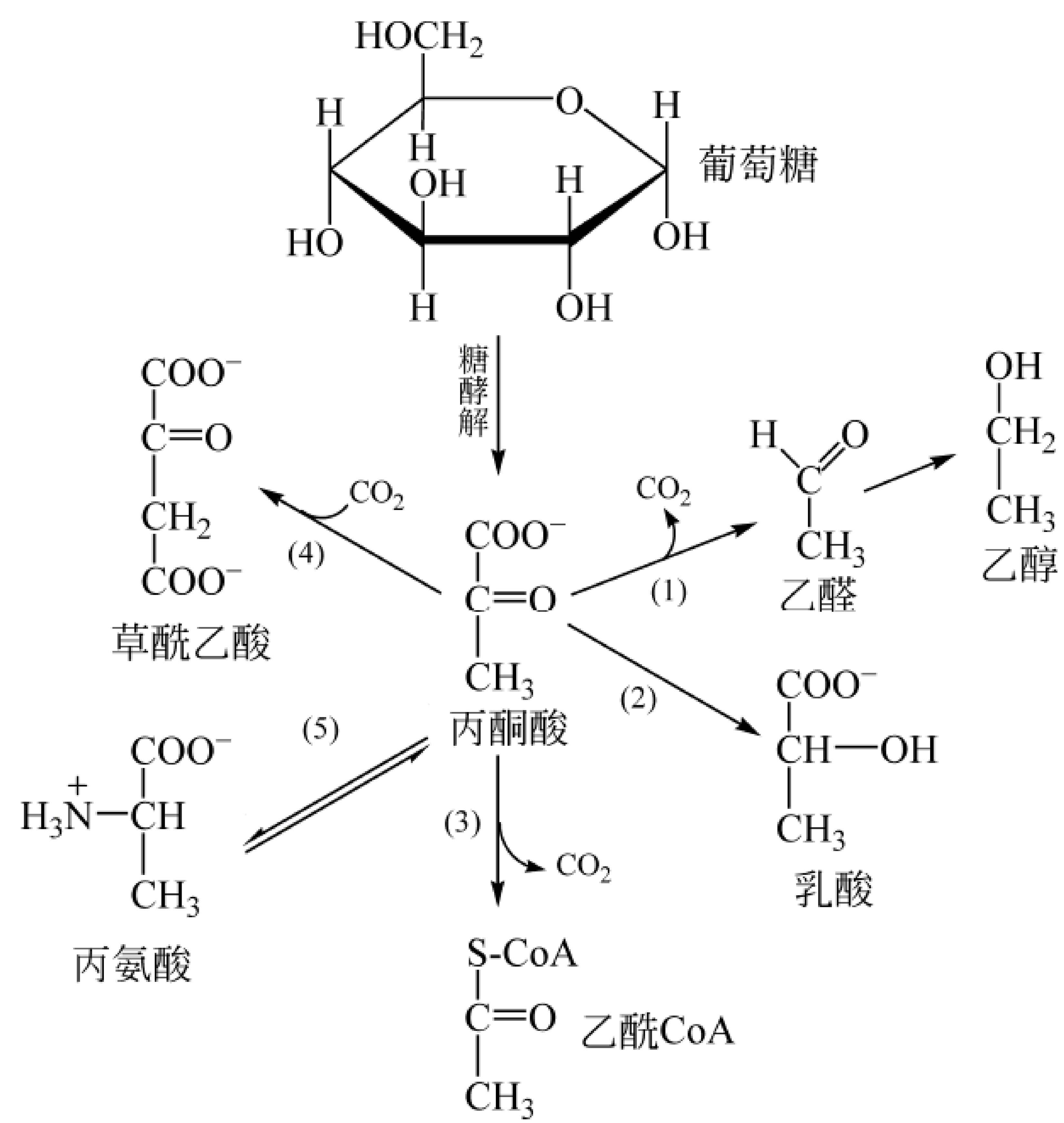


图 13.15　丙酮酸命运

(1) 酒精发酵:无氧条件下丙酮酸经发酵生成乙醇;(2) 乳酸发酵:葡萄糖通过无氧糖酵解生成乳酸;(3) 有氧条件下丙酮酸被氧化为乙酰 CoA;(4) 丙酮酸羧化生成草酰乙酸;(5) 丙酮酸经转氨生成丙氨酸

1. 乙醇(酒精)发酵

在无氧条件下,酵母和其他一些微生物可以将丙酮酸转化为乙醇和 CO_2,同时 NADH 被氧化为 NAD^+,这一过程称为乙醇发酵(alcoholic fermentation)。首先在硫胺素焦磷酸(TPP)作为辅酶的丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)催化下,丙酮酸脱羧生成乙醛。乙醛在含锌的醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)催化下还原为乙醇,NADH 被氧化为 NAD^+。NAD^+ 又可返回参与甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化反应,可以使由葡萄糖发醇生产乙醇的过程连续进行下去(图 13.16)。

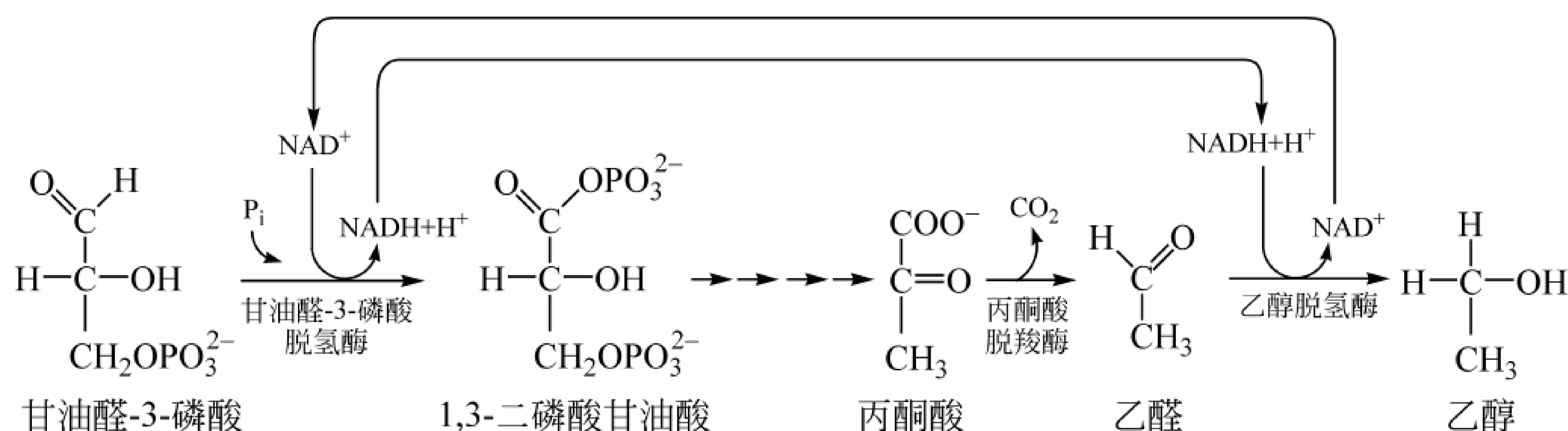


图 13.16　乙醇发酵

1 分子葡萄糖经乙醇发酵途径转化为乙醇的总反应为:


$$葡萄糖+2P_i+2ADP+2H^+ \longrightarrow 2乙醇+2CO_2+2ATP+2H_2O$$

2. 乳酸发酵

在无氧条件下,许多种微生物在称为乳酸发酵(lactate fermentation)的过程中可以将丙酮酸还原为乳酸(lactate)。当氧气量供应有限时,这样的反应也会在高等生物的细胞,例如剧烈运动的肌肉细胞中发生。在乳酸脱氢酶(lactate,dehydrogenase,LDH)催化下,丙酮酸被 NADH 还原为乳酸,同时生成 NAD^+,NAD^+ 又可用于甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化的反应,使得糖酵解能够连续进行(图 13.17)。

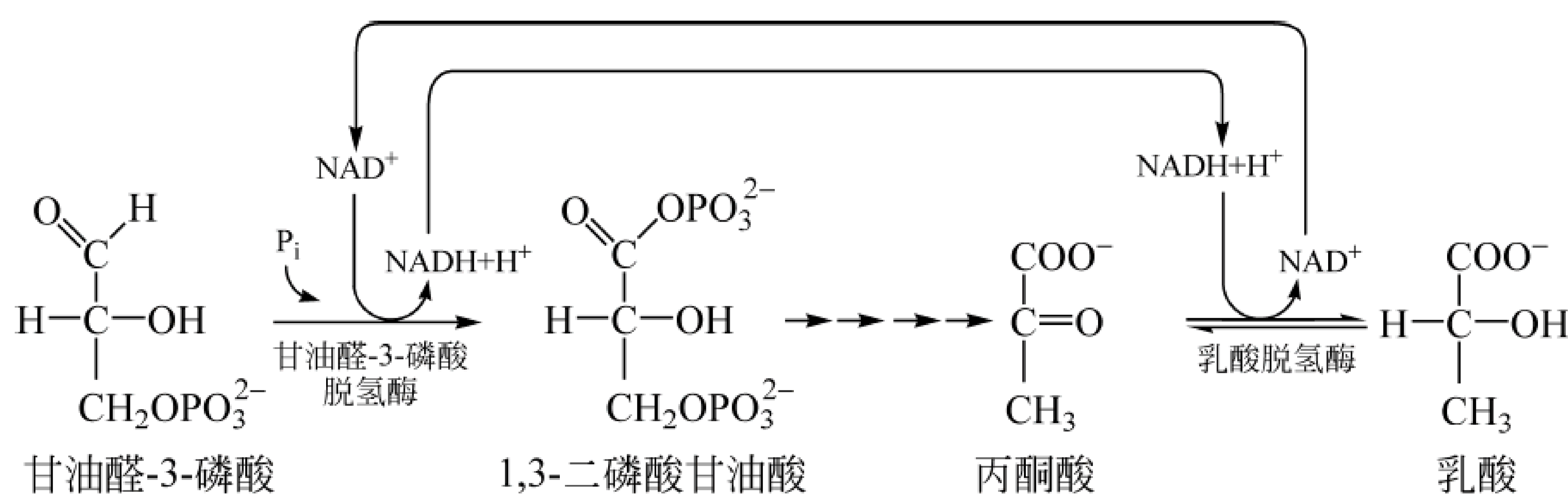
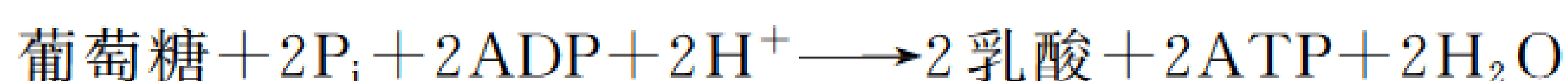


图 13.17　乳酸发酵

在无氧条件下,一分子葡萄糖经丙酮酸转化为乳酸的总反应为:


$$葡萄糖+2P_i+2ADP+2H^+ \longrightarrow 2乳酸+2ATP+2H_2O$$

1 分子葡萄糖经乳酸发酵至乳酸净生成 2 分子 ATP。虽然只获得 2 分子 ATP,但无氧糖酵解不仅对厌氧生物是非常必要的,而且对需氧生物也是必要的。例如人不能在完全缺氧的环境中生存,但能够耐受短暂的供氧不足。剧烈运动(例如百米跑)会快速消耗氧,而由于呼吸急促暂时缺氧,在这样的缺氧条件下,运动需要的能量主要靠无氧糖酵解途径供给。

此时肌肉中葡萄糖只有转化为乳酸,才能利用大量葡萄糖经糖酵解产生大量能量维持剧烈运动。但无氧糖酵解会造成乳酸堆积,乳酸堆积会使肌肉“酸痛”。不过酸痛在剧烈运动过后一段时间内会消除,这主要得益于体内的Cori循环(图13.18)。

Cori循环涉及肌肉、肝和血液。从图13.18中可以看到无氧条件下葡萄糖经糖酵解转化为乳酸,堆积的乳酸扩散到血液中,经血液转运到肝脏。在肝脏,乳酸重新氧化为丙酮酸,然后丙酮酸经糖异生途径生成葡萄糖,然后经血液转运回肌肉组织。Cori循环在剧烈运动期间非常活跃,肝处理堆积乳酸需要的额外能量ATP应当由有氧代谢供给(后面讲到的氧化磷酸化)。增加的有氧代谢需要额外的氧,大概每个人都有体会,剧烈运动过后往往要急促呼吸,为的是还“氧债”。

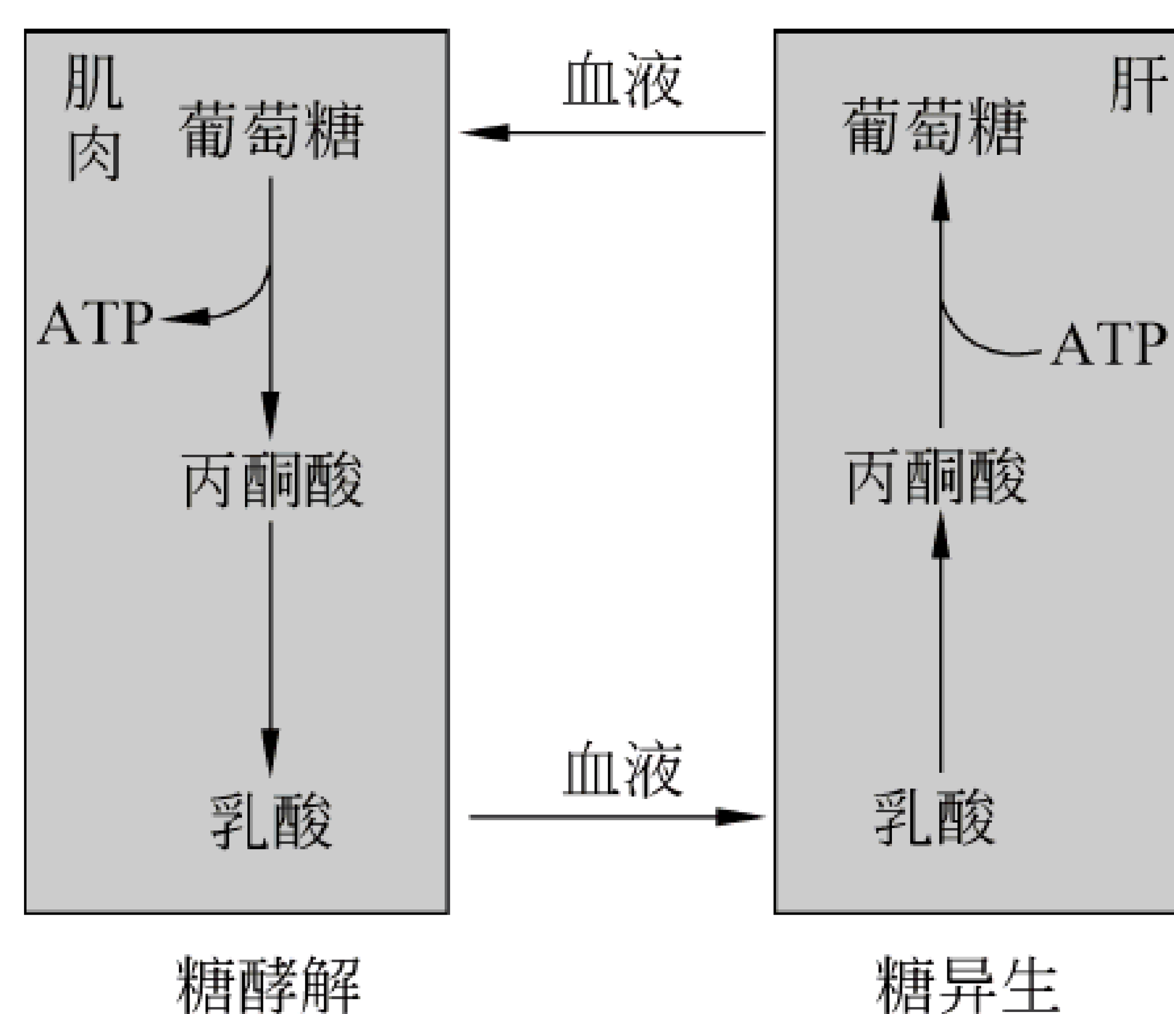


图13.18 Cori循环

肌肉糖酵解将葡萄糖转化为乳酸,血液将乳酸转运到肝脏。在肝脏,乳酸又重新被氧化为丙酮酸,经糖异生途径转化为葡萄糖。生成的葡萄糖经血液又转运回肌肉

3. 丙酮酸转化为乙酰CoA,彻底氧化为CO_2

在无氧条件下,葡萄糖转化为乙醇或乳酸,产物仍为二碳或三碳化合物,没有完全氧化,所以释放的只是部分能量。因此要获得更多能量和使NAD^+再生,葡萄糖经糖酵解生成的丙酮酸首先要转化为乙酰CoA,然后借助于柠檬酸循环和电子传递系统被彻底氧化,但这一过程需要在有氧条件下才能实现。

相关话题　糖酵解与PET

70多年以前,德国Kaiser Wilhelm生物学院的Otto Warburg证实大多数动物和人肿瘤与正常组织相比,因肿瘤所需能量主要靠糖酵解,所以糖酵解速率要高得多。这一观察就是现代化诊断肿瘤的正电子成像术(positron emission tomography,PET)的生物化学基础。PET利用含有缺少中子的核素,例如^{11}C和^{18}F作为分子探针。一个类似葡萄糖的2-^{18}F-2-脱氧-葡糖(FDG)(氟代脱氧葡糖)分子就是一个典型的示踪剂(或称显像剂)。注射到人体内的^{18}F核因一个质子的正电子(一个反物质粒子)的发射而不稳定,自发衰变,从而将一个质子转变为一个中子,导致^{18}F转变为^{18}O。发射的正电子通常移动距离短(小于1mm),并与组织中一个电子碰撞,两粒子湮灭并发出能量同为511keV,但方向相反互成180°的一对高能光子—γ射线。用专用显像设备进行γ射线检测可以制作出感兴趣组织中显像剂所在位置的三维模型。FDG被人体细胞(例如脑细胞)吸收后,在糖酵解第一步反应中被己糖激酶转变为2-[^{18}F]-2-脱氧-葡糖-6-磷酸,并积聚在细胞质中。积累的FDG与发生在这些细胞中的糖酵解程度成正比。因此PET扫描中FDG积聚异常高的部位就被识别为肿瘤部位(图13.19)。

PET大都与CT组合,名称为PET-CT:正电子发射计算机断层显像。现在国内三级医院大都配备PET-CT仪。

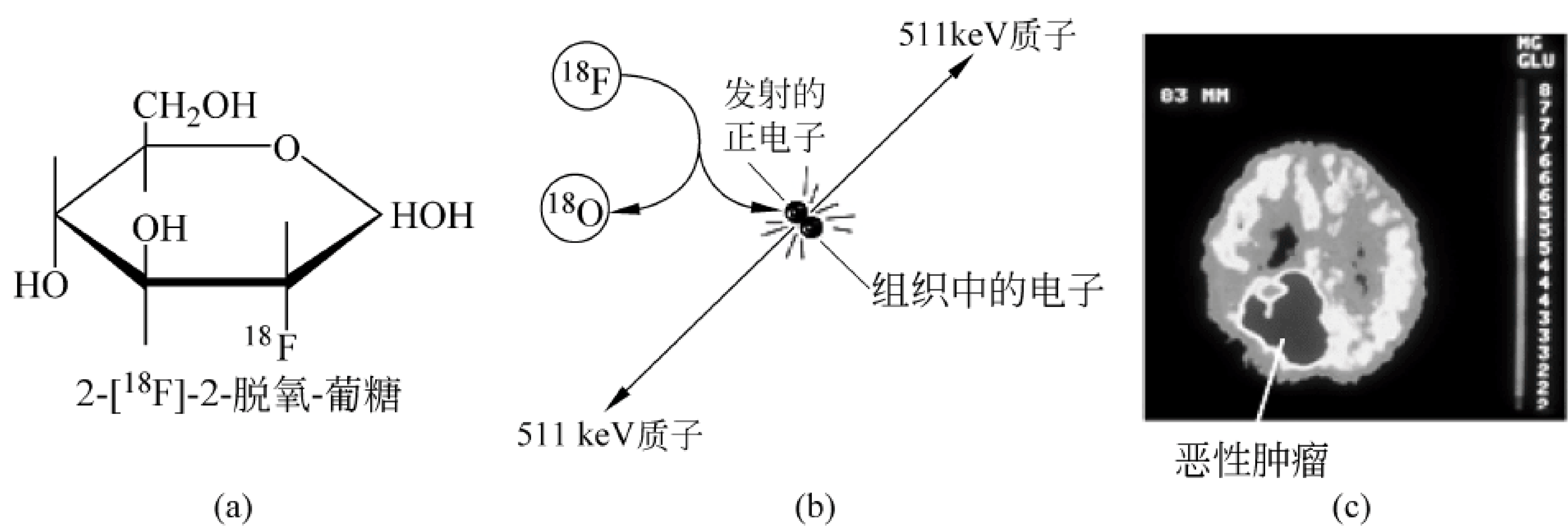


图 13.19　肿瘤诊断运用 PET

(a) 示踪剂：^{18}FDG；(b) 正电子发射原理；(c) 服用^{18}FDG 后人脑 PET 图像

13.1.3　糖酵解的调控

从表 13.1 可看到，在生理条件下，红细胞中的糖酵解只有己糖激酶、磷酸果糖激酶-1和丙酮酸激酶催化的 3 步反应有很大的负自由能变化，都是不可逆反应，所以这 3 个酶是糖酵解途径的调控酶(图 13.20)。

1. 己糖激酶

己糖激酶受到葡糖-6-磷酸的别构抑制，但同工酶葡糖激酶例外。葡糖-6-磷酸有几种代谢途径，其中之一是进行糖酵解产生能量，当能量过剩时，葡糖-6-磷酸可作为糖原合成的前体。然而当葡糖-6-磷酸积累和不再需要生产能量或进行糖原储存时，即葡糖-6-磷酸不能快速代谢时，己糖激酶被葡糖-6-磷酸抑制。

2. 磷酸果糖激酶-1

磷酸果糖激酶-1(PFK-1)催化的果糖-6-磷酸磷酸化为果糖-1,6-二磷酸反应是糖酵解途径的第二个调节部位，该酶是一个别构酶。PFK-1 是个寡聚酶，相对分子质量很大(130 000～160 000)，细菌和哺乳动物的 PFK-1 都是四聚体，酵母的 PFK-1 是八聚体酶。

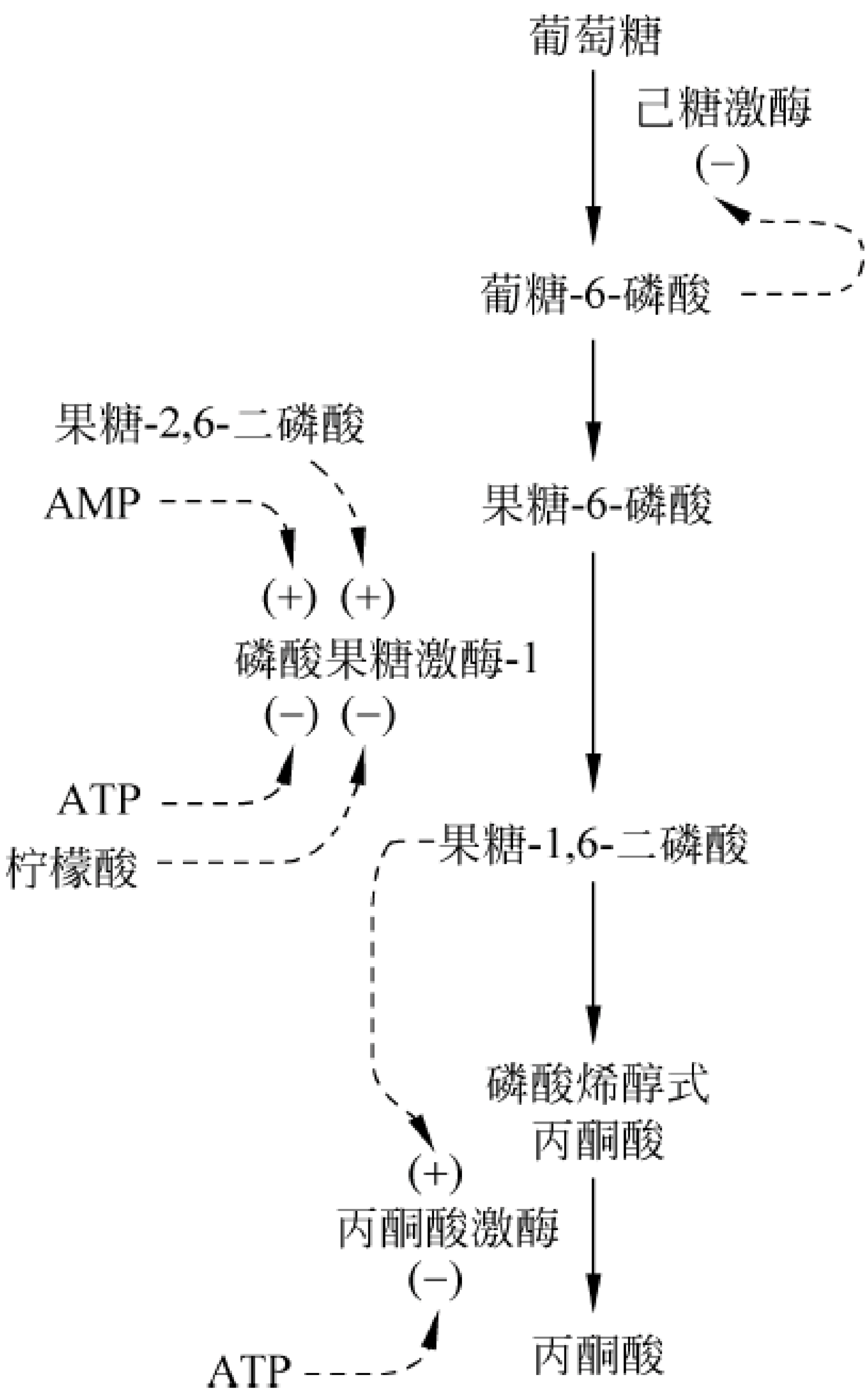


图 13.20　糖酵解的主要调控点

(＋)表示促进反应，(－)表示抑制反应

ATP 既是 PFK-1 的底物，又是该酶的别构抑制剂，ATP 可以使该酶对底物果糖-6-磷酸的亲和性降低，即对果糖-6-磷酸的 K_m 增加。在哺乳动物细胞中，AMP 是别构激活剂，可以缓解 ATP 对 PFK-1 的抑制作用。柠檬酸是 PFK-1 的另一个重要抑制剂，因为柠檬酸循环是与丙酮酸的进一步氧化联系在一起的，柠檬酸水平升高，表明有充足底物进入了柠檬酸循环，所以柠檬酸对 PFK-1 的调节是一种反馈抑制。

另外，1980 年发现分布于哺乳动物、真菌和植物中的果糖-2,6-二磷酸也是 PFK-1 的激

活剂。果糖-2,6-二磷酸是在磷酸果糖激酶-2(phosphofructokinase-2,PFK-2)催化下,由果糖-6-磷酸磷酸化生成的(图13.21)。令人惊奇的是,在哺乳动物的肝中同一个PFK-2的不同活性部位催化果糖-2,6-二磷酸的去磷酸化反应,重新生成果糖-6-磷酸,酶的这一活性称为果糖-2,6-二磷酸磷酸酶(fructose-2,6-bisphosphatase)活性。PFK-2的双重活性控制着果糖-2,6-二磷酸的稳态浓度。

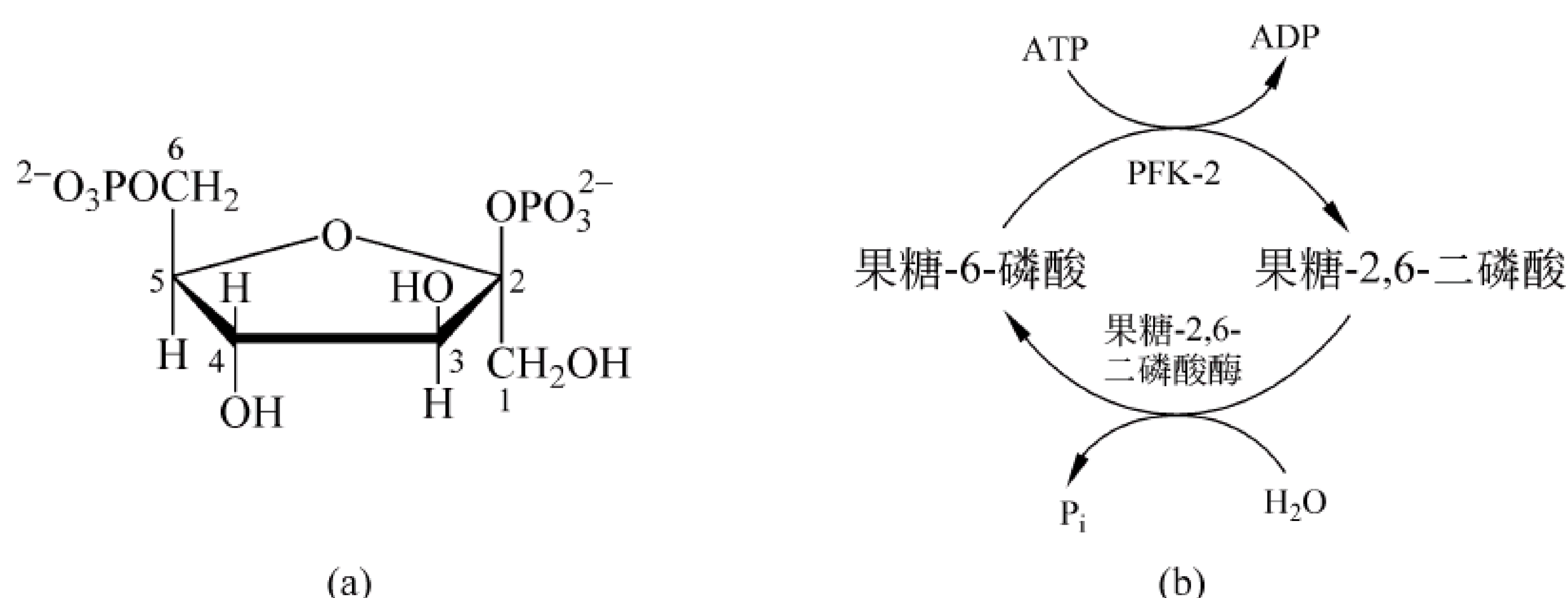


图13.21 果糖-2,6-二磷酸的生成和去磷酸

(a)果糖-2,6-二磷酸结构;(b)PFK-2的双重活性:催化果糖-6-磷酸生成果糖-2,6-二磷酸,又催化果糖-2,6-二磷酸去磷酸重新生成果糖-6-磷酸

3. 丙酮酸激酶

在哺乳动物组织中存在着4种丙酮酸激酶同工酶,这些同工酶受到果糖-1,6-二磷酸激活和ATP的抑制。由于果糖-1,6-二磷酸既是丙酮酸激酶的别构激活剂,又是PFK-1催化反应的产物,所以PFK-1的激活自然会引起丙酮酸激酶的激活,这种类型的调控方式称为前馈激活(feed-forward activation)。

13.1.4 其他几种单糖的代谢

作为糖酵解的底物当属最丰富的葡萄糖,特别是在脊椎动物中,葡萄糖在血液中循环,可作为能源供给各个组织。除了葡萄糖之外,其他种类的糖,例如蔗糖、果糖、半乳糖及甘露糖也可以经糖酵解途径被降解。

1. 果糖

果糖和含有果糖的二糖蔗糖是许多食物和饮料的甜味剂。蔗糖经蔗糖酶催化生成一分子葡萄糖和一分子果糖,吸收的果糖几乎都是通过肝代谢的。特异的果糖激酶(fructokinase)催化果糖磷酸化生成果糖-1-磷酸,然后在果糖-1-磷酸醛缩酶(fructose-1-phosphate aldolase)催化下裂解生成磷酸二羟丙酮和甘油醛,两者都可转换为甘油醛-3-磷酸,进入糖酵解进一步代谢。总的转化结果是1分子果糖转化为2分子甘油醛-3-磷酸,同时消耗了2分子ATP(图13.22)。

2. 半乳糖

乳糖是二糖,主要存在于奶中,婴幼儿通过小肠乳糖酶作用可代谢乳糖。乳糖酶(lactase)催化乳糖水解为1分子葡萄糖和1分子半乳糖,这2种单糖都可被小肠吸收和通过血液循环系统转运。葡萄糖直接进入糖酵解,半乳糖还需转换为葡糖-6-磷酸(图13.23)。

在肝中半乳糖在半乳糖激酶(galactokinase)催化下磷酸化,生成半乳糖-1-磷酸。然后在半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(galactose-1-phosphate uridylyltransferase)催化下,半乳糖-1-磷酸

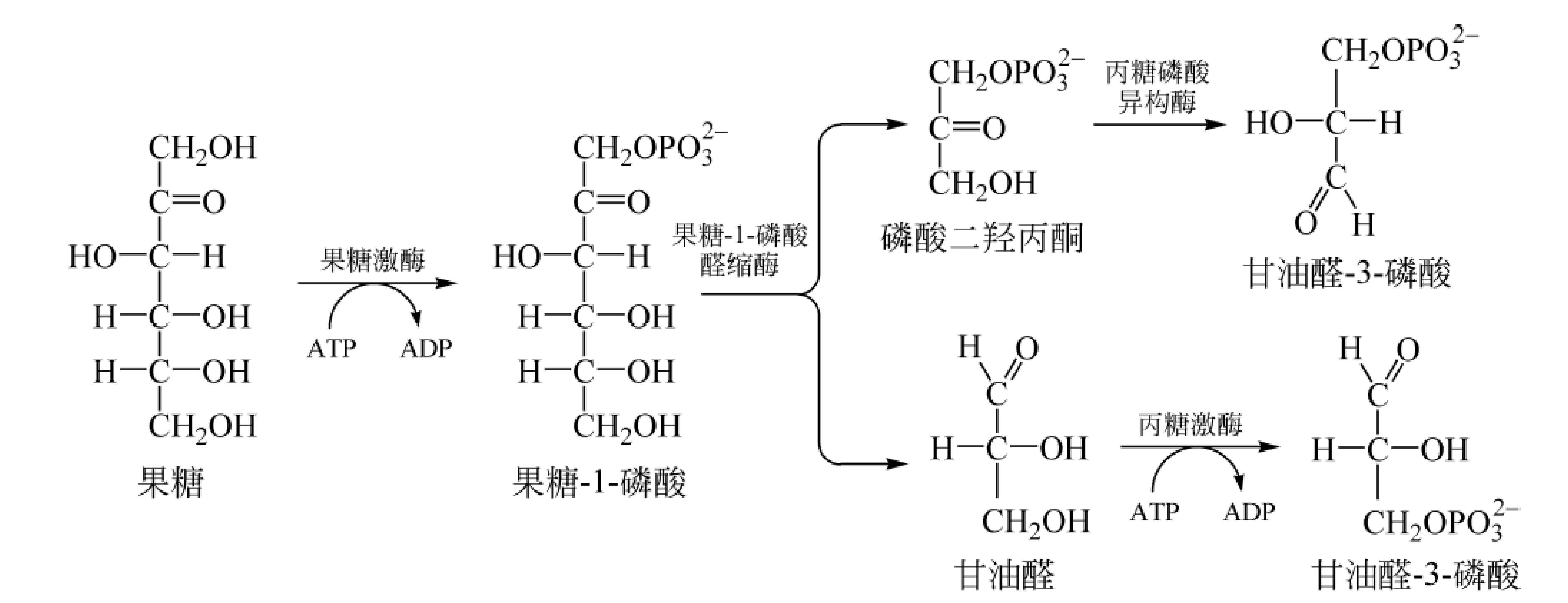


图 13.22 1 分子果糖转化为 2 分子甘油醛-3-磷酸

与 UDP-葡糖反应生成葡糖-1-磷酸和 UDP-半乳糖。葡糖-1-磷酸在磷酸葡糖变位酶作用下转换为葡糖-6-磷酸后进入糖酵解。UDP-半乳糖在 UDP-葡糖-4-差向异构酶(UDP-glucose-4-epimerase)作用下重新生成 UDP-葡糖。

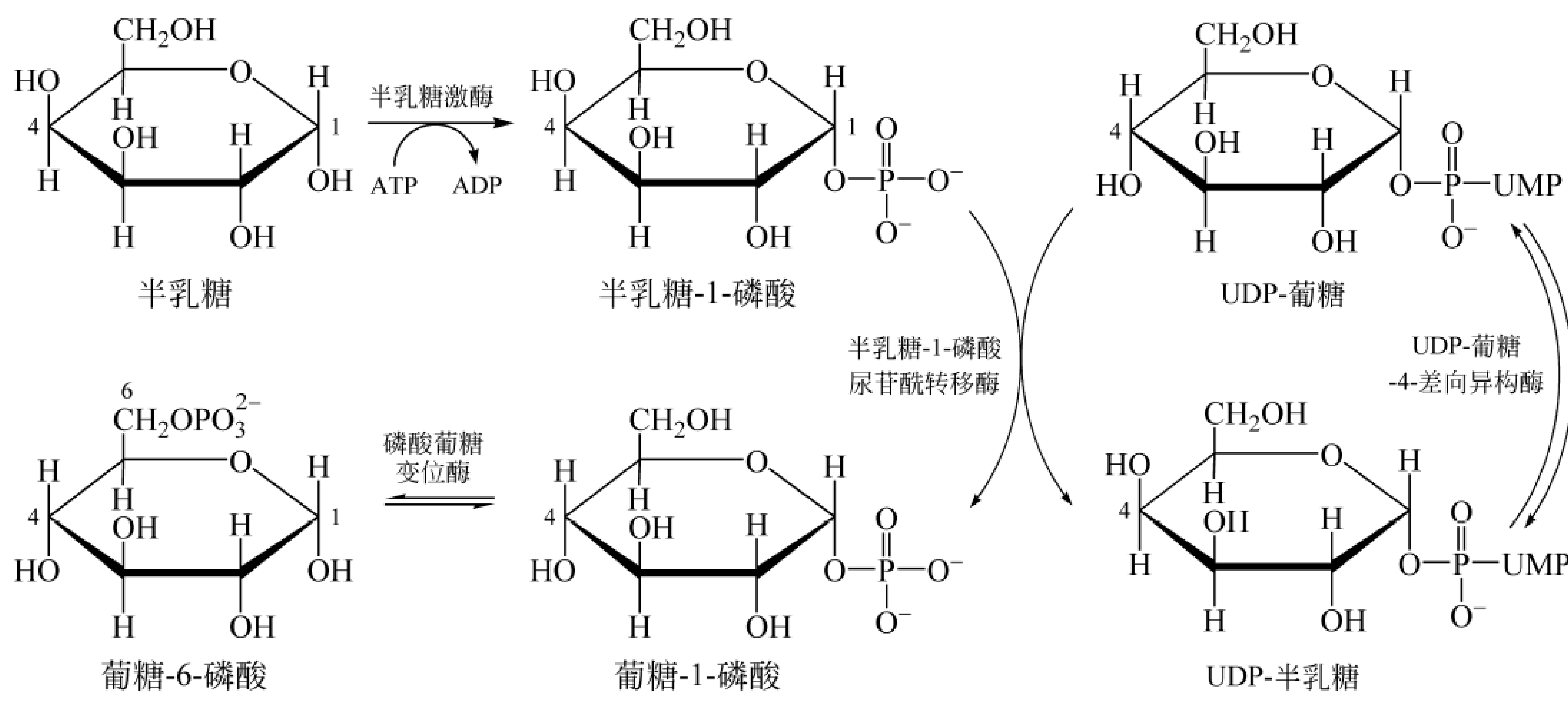


图 13.23 半乳糖转换为葡糖-6-磷酸

喂食奶制品的婴幼儿依赖于半乳糖代谢途径,然而由于半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶缺乏患有半乳糖血症(galactosemia)的婴幼儿不能正常代谢半乳糖。结果造成细胞内半乳糖-1-磷酸的堆积,损害肝的功能。另外,还可能损伤中枢神经系统。在婴儿出生时,通过检测脐带红细胞中半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶,可以确定是否患有半乳糖血症。如果在饮食中去掉乳糖可以避免这种遗传病带来的严重后果。

3. 甘露糖

甘露糖主要来自糖蛋白和某些多糖,在己糖激酶催化下甘露糖转化为甘露糖-6-磷酸。然后在磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase)的作用下,甘露糖-6-磷酸异构化生成果糖-6-磷酸(图 13.24)。

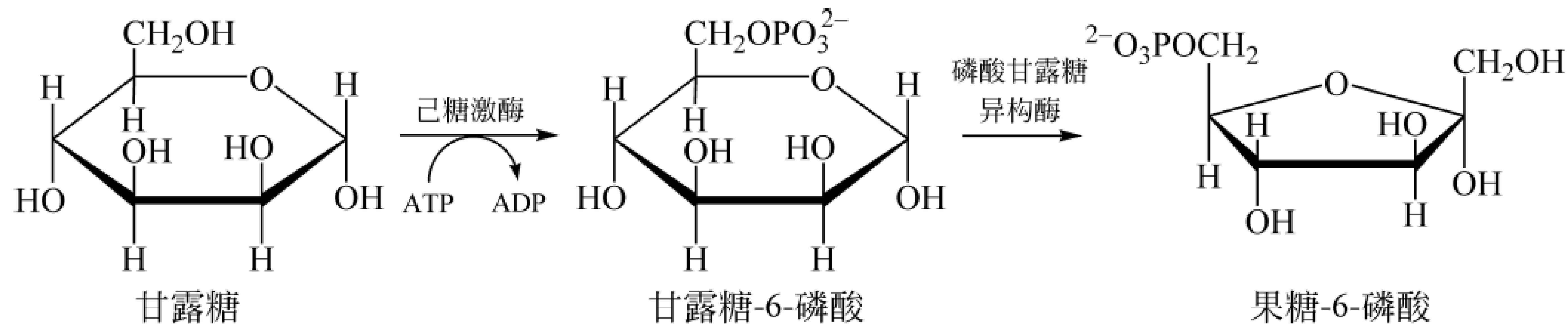


图 13.24 甘露糖转化为果糖-6-磷酸

13.2 Entner-Doudoroff 途径

经典的糖酵解途径也称为 Embden-Meyerhof-Parnas(EMP)途径,所有真核生物和许多种类细菌都存在这个途径。然而,大多数种类的细菌不具有磷酸果糖激酶-1,所以在己糖激酶阶段不能将葡糖-6-磷酸转换为果糖-1,6-二磷酸,但这些细菌可通过 Entner-Doudoroff 旁路绕过己糖激酶反应使葡糖-6-磷酸进入糖酵解(图 13.25)。

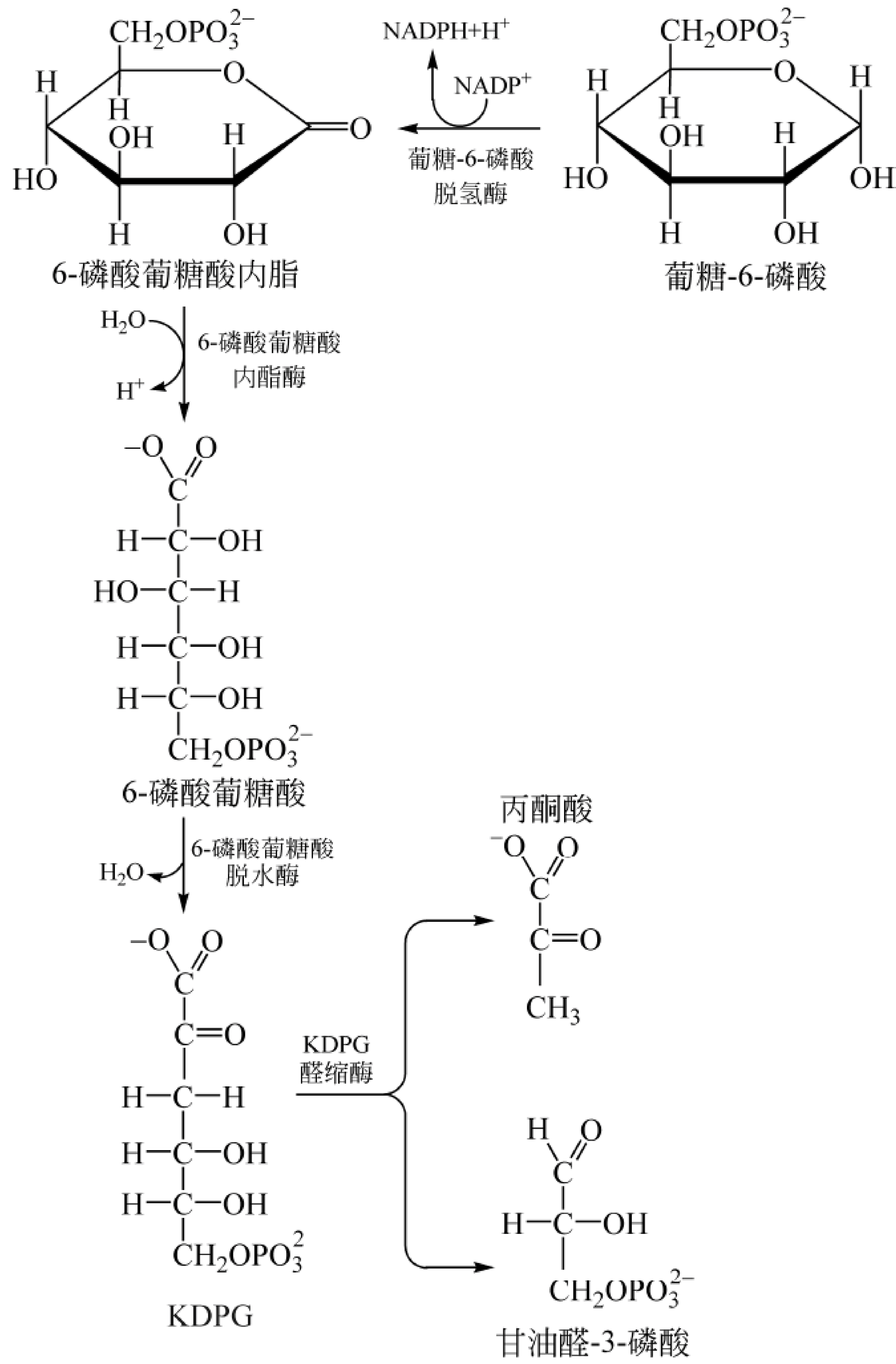


图 13.25 Entner-Doudoroff 途径

Entner-Doudoroff 途径开始于由葡糖-6-磷酸经由葡糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡糖酸内酯酶两步酶反应转化为 6-磷酸葡糖酸。然后在 6-磷酸葡糖酸脱水酶催化下 6-磷酸葡糖酸转换为 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡糖酸(KDPG),KDPG 在 KDPG 醛缩酶催化下裂解为一分子丙酮酸和一分子甘油醛-3-磷酸。丙酮酸是糖酵解的终产物,而甘油醛-3-磷酸可以经由糖酵解的三糖阶段转换为另一分子丙酮酸。

除了存在主要的葡萄糖降解途径的一些生物之外,在那些具有完整糖酵解途径的生物中 Entner-Doudoroff 途径也很重要。Entner-Doudoroff 常被用于葡糖酸和其他一些相关有机酸的代谢。包括 *E. coli* 在内的许多细菌可以在作为惟一碳源的葡糖酸中生长,这样环境下主要产能途径是 Entner-Doudoroff 途径。

13.3　糖酵解旁路——戊糖磷酸途径

糖代谢除了糖酵解之外,还存在着第二条称为糖酵解旁路的戊糖磷酸途径(pentosephosphate pathway),也称为己糖磷酸支路(hexosephosphate shunt),途径中所有反应都在细胞溶胶中进行。图 13.26 是戊糖磷酸途径与糖酵解关系的一个简图,图 13.27 给出了完整的戊糖磷酸途径。

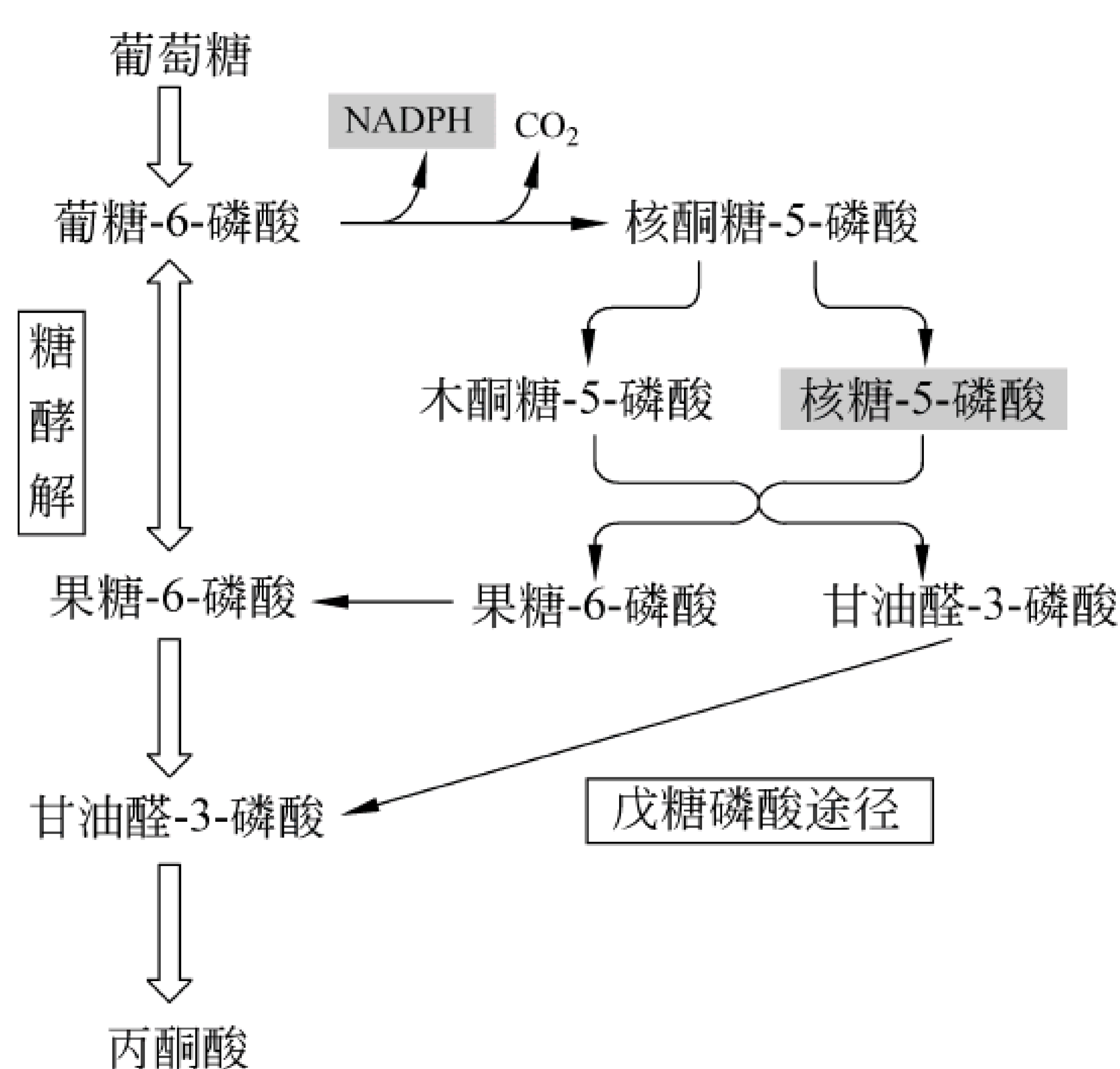


图 13.26　戊糖磷酸途径与糖酵解的关系

戊糖磷酸途径开始于葡糖-6-磷酸,产生的 NADPH 用于还原反应,核糖-5-磷酸用于核苷酸的合成。过量的核糖-5-磷酸通过一系列反应可转变为糖酵解中间物

戊糖磷酸途径的主要用途是提供重要代谢物 NADPH 和核糖-5-磷酸。NADPH 是以还原力形式存在的化学能载体,在还原性生物合成中普遍被用作还原剂;而产生的核糖-5-磷酸主要用于核酸的生物合成。在合成脂肪酸、胆固醇的组织,例如乳腺、肝、肾上腺和脂肪等组织都富含戊糖磷酸途径中的酶,戊糖磷酸途径最活跃。事实上,肝中有 30%葡萄糖不是通过糖酵解,而是通过戊糖磷酸途径被氧化的。

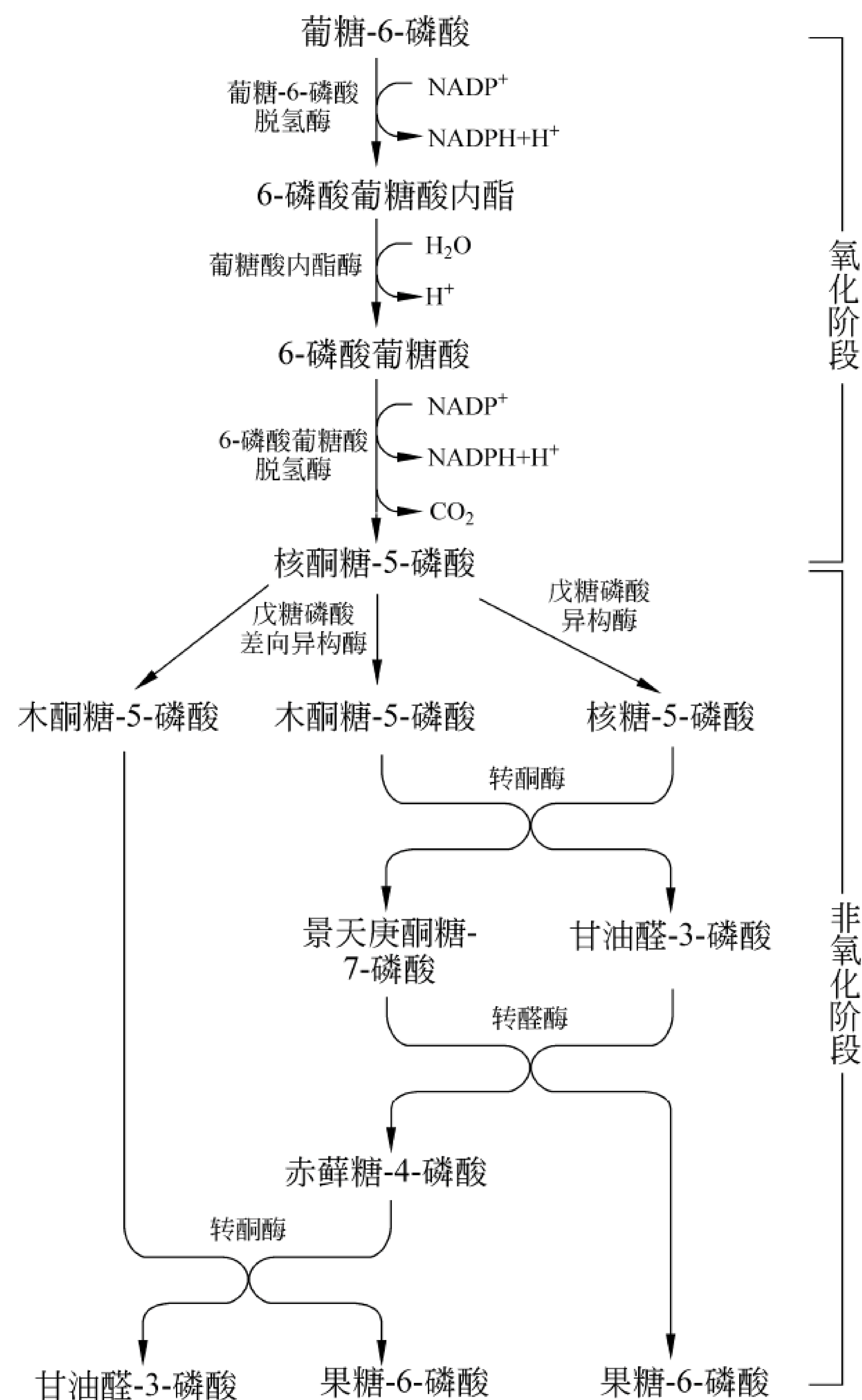


图 13.27　戊糖磷酸途径

13.3.1　生成 NADPH 的氧化阶段

从图 13.27 看到戊糖磷酸途径被分为生成 NADPH 的氧化阶段和提供核糖-5-磷酸的非氧化阶段。氧化阶段是从葡糖-6-磷酸开始直至生成核酮糖-5-磷酸的具体反应过程(图 13.28)。

氧化阶段第一个反应由葡糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase，G6PD)催化，葡糖-6-磷酸脱氢转化成 6-磷酸葡糖酸内酯，反应中 $NADP^+$ 被还原为 NADPH。这步反应是整个戊糖磷酸途径的主要调节部位，葡糖-6-磷酸脱氢酶受 NADPH 的别构抑制，通过这一简单调节，戊糖磷酸途径可以自我限制 NADPH 的生产。氧化阶段的第二个酶是葡糖酸内酯酶(gluconolactonase)，它催化 6-磷酸葡糖酸内酯水解生成 6-磷酸葡糖酸，最后，6-磷酸葡糖酸在 6-磷酸葡糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase)催化下氧化脱羧生成核酮糖-5-磷酸、CO_2 和另 1 分子的 NADPH。氧化反应阶段的总反应为：

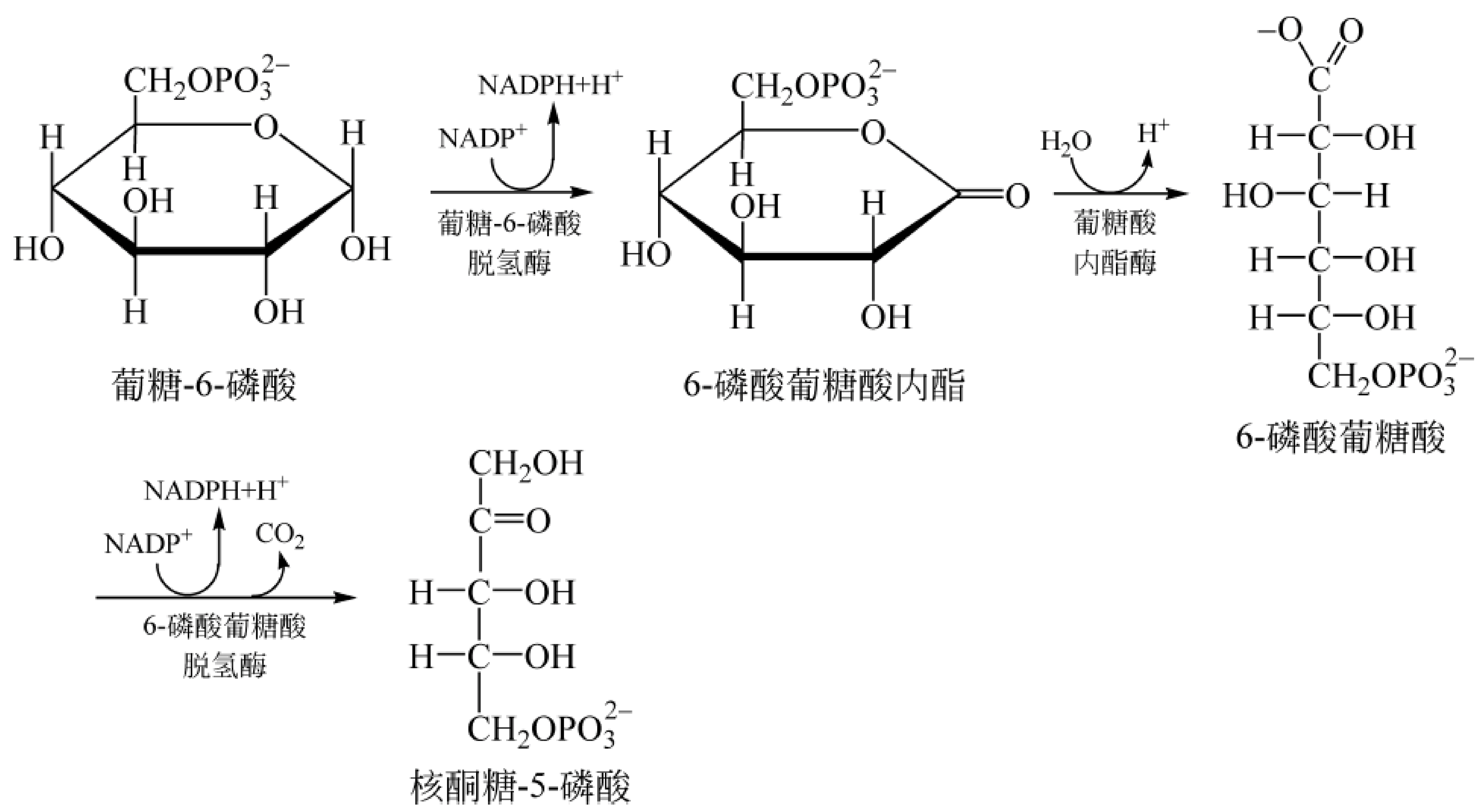
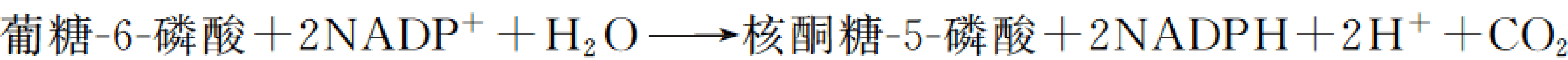


图 13.28　戊糖磷酸途径氧化阶段的反应



葡糖-6-磷酸$+2NADP^{+}+H_2O \longrightarrow$核酮糖-5-磷酸$+2NADPH+2H^{+}+CO_2$

如果细胞需要大量的 NADPH 和核苷酸，则所有的核酮糖-5-磷酸都可异构化形成核糖-5-磷酸，戊糖磷酸途径就会终止于氧化阶段。通常需要的 NADPH 要比核糖-5-磷酸多，所以大多数核糖-5-磷酸都转换为糖酵解的中间产物。

13.3.2　提供核糖-5-磷酸的非氧化阶段

在非氧化阶段，首先核酮糖-5-磷酸可分别在戊糖磷酸差向异构酶和戊糖磷酸异构酶的催化下，转换为木酮糖-5-磷酸和核糖-5-磷酸（图 13.29）。

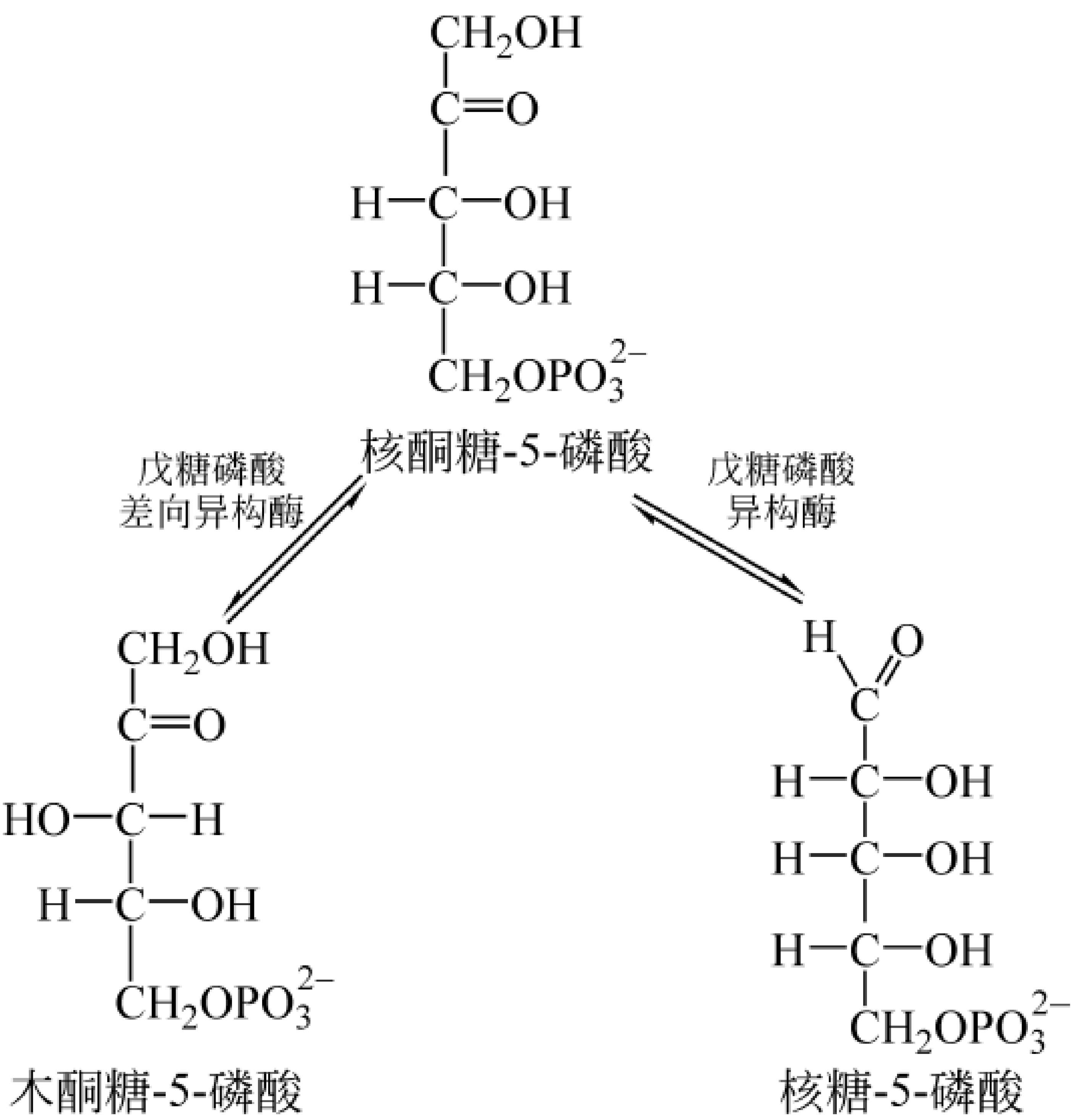


图 13.29　核酮糖-5-磷酸转换为木酮糖-5-磷酸和核糖-5-磷酸

然后,木酮糖-5-磷酸和核糖-5-磷酸经转酮酶(transketolase)催化形成七碳产物景天庚酮糖-7-磷酸和三碳产物甘油醛-3-磷酸。这两种产物再经转醛酶(transaldolase)催化转换为果糖-6-磷酸和赤藓糖-4-磷酸(图13.30)。生成的赤藓糖-4-磷酸再与另1分子的木酮糖-5-磷酸经转酮酶催化生成果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸。生成的果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸都是糖酵解的中间产物,可以进行分解代谢,也可以经糖异生途径再生成葡糖-6-磷酸。

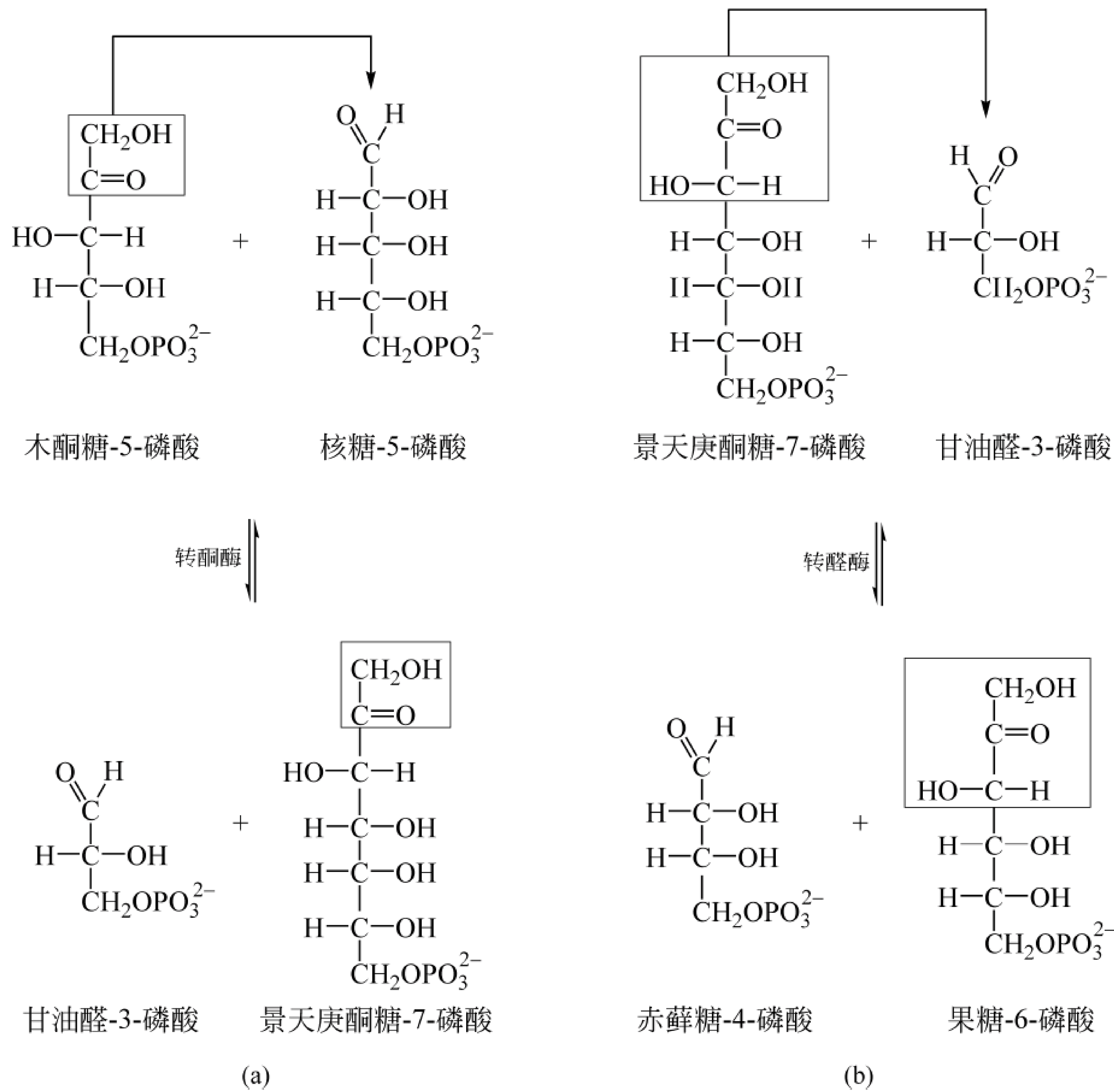


图13.30 转酮反应和转醛反应

(a) 转酮反应;(b) 转醛反应

小结

1. 糖酵解是葡萄糖被降解为丙酮酸的一个糖分解代谢途径,涉及10步反应,分为己糖和丙糖两个反应阶段。己糖阶段的产物是甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮。在丙糖阶段,丙糖磷酸转换为甘油醛-3-磷酸,然后代谢为丙酮酸。

2. 每一分子葡萄糖转化为两分子丙酮酸,净生成两分子ATP,以及两分子NAD^+被还原为两分子NADH。

3. 在无氧条件下酵母可以将丙酮酸代谢为乙醇和 CO_2，有些微生物及人剧烈运动，短暂缺氧条件下能够将丙酮酸转化为乳酸。这两个过程都能将 NADH 氧化为 NAD^+，使得糖酵解过程得以继续进行。

4. 己糖激酶、磷酸果糖激酶-1 和丙酮酸激酶催化的反应是不可逆反应，也是糖酵解的调控部位。

5. 果糖、半乳糖和甘露糖通过转化为糖酵解中间物可以进入糖酵解途径。

6. 包括 *E. coli* 在内的许多细菌可以在作为惟一碳源的葡糖酸中生长，这样环境下主要产能途径是 Entner-Doudoroff 途径，而不是经典的糖酵解途径。

7. 戊糖磷酸途径代谢葡糖-6-磷酸生成 NADPH 和核糖-5-磷酸。在该途径的氧化阶段，每分子葡糖-6-磷酸转化为核酮糖-5-磷酸和 CO_2，并生成两分子 NADPH。非氧化阶段包括核酮糖-5-磷酸异构化为核糖-5-磷酸，转酮酶和转醛酶联合作用将这两种戊糖磷酸转化为糖酵解中间产物甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸。

习题

1. 计算由下列每 1 分子糖无氧转化至乳酸净获得的 ATP 分子数。

(a)葡萄糖；(b)果糖；(c)甘露糖和(d)蔗糖(蔗糖酶反应：蔗糖＋P_i $\longrightarrow$ 果糖＋葡糖-1-磷酸；葡糖-1-磷酸异构化为葡糖-6-磷酸)

2. 丙糖磷酸异构酶催化磷酸二羟丙酮转化为甘油醛-3-磷酸，$\Delta G^{\ominus\prime}$为＋7.56kJ/mol，在红细胞糖酵解实验中观察到的 $\Delta G'$为＋2.41kJ/mol。

(a) 计算在 37℃，该 $\Delta G'$下[磷酸二羟丙酮]/[甘油醛-3-磷酸]比率。

(b) 如果[磷酸二羟丙酮]＝0.2mol，[甘油醛-3-磷酸]为多少？

3. 肌肉中醛缩酶反应的 $\Delta G^{\ominus\prime\prime}$为＋23.9kJ/mol，这种情况下为什么在糖酵解中醛缩酶反应能够按照生成磷酸二羟丙酮(DHAP)和甘油醛-3-磷酸的方向进行呢？

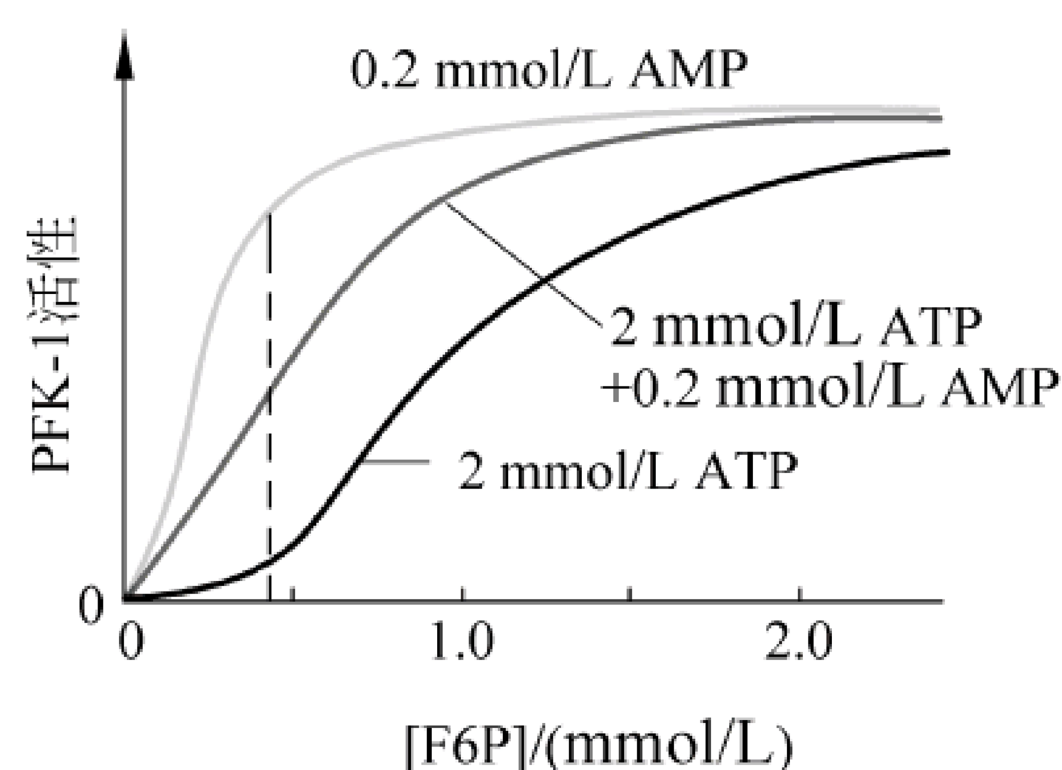
4. 为什么己糖激酶和磷酸果糖激酶-1 都受到 ATP 类似物的抑制？该 ATP 类似物是 ATP 中与 β-和 γ-磷原子连接的氧原子被一个—CH_2—基团取代后的产物。

5. 在肌细胞中葡萄糖转换为乳酸释放出的自由能只相当于它完全氧化为 CO_2 和 H_2O 释放的自由能的 7%。这是否意味着肌肉中的无氧糖酵解是葡萄糖的一种浪费呢？

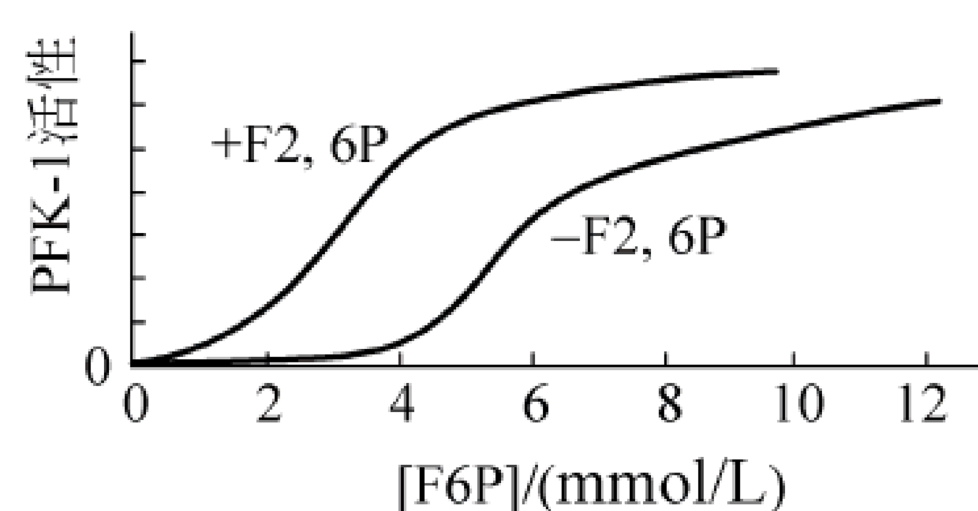
6. 在一个核素跟踪实验中，将^{14}C 标记的甘油醛-3-磷酸加入到可进行糖酵解的酵母提取物后不久，发现分离出的果糖-1,6-二磷酸中的 C-3 和 C-4 是被^{14}C 标记的。^{14}C 标记在起始的甘油醛-3-磷酸中的哪个碳上才能使^{14}C 出现在这两个碳上？

7. 砷酸盐(AsO_4^{3-})结构类似于磷酸盐，在以磷酸盐为底物的所有反应中，砷酸盐都可以作为底物参与。与磷酸酯不同，砷酸酯在动力学和热力学上都是不稳定的，会很快水解。请写出在有 ATP、ADP、NAD^+ 和(a)磷酸盐存在时，(b)砷酸盐存在时，由葡萄糖转化成丙酮酸的总反应平衡式。(c)为什么说砷酸盐是一种毒药？

8. 下图表示在(a)ATP、AMP 或两者都存在，(b)果糖-2,6-磷酸(F2,6P)存在或不存在条件下，哺乳动物磷酸果糖激酶-1(PEK-1)活性对果糖-6-磷酸(F6P)浓度变化图，请解释这些条件对磷酸果糖激酶-1 反应速率的影响。



(a)



(b)

9. 通过果糖 1,6-二磷酸激活丙酮酸激酶有什么益处?

10. 戊糖磷酸途径和糖酵解途径相互依存,因为它们都拥有几种相同的代谢物,这些代谢物浓度影响两个途径中酶的速率。请给出这几种代谢物。

11. 核酮糖-5-磷酸可分别经差向异构酶和异构酶催化生成木酮糖-5-磷酸和核糖-5-磷酸。这些异构化有什么区别?

12. 在许多组织中,对细胞损伤的最初反应之一就是快速增加戊糖磷酸途径中酶的水平。伤后 10 天,心脏组织的葡糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡糖酸脱氢酶的水平是正常水平的 20~30 倍,而糖酵解酶的水平只是正常水平的 10%~20%。对此现象请给出一个合理的解释。

13. 红细胞没有糖原储备,只能依赖于糖酵解和戊糖磷酸途径降解葡萄糖来维持细胞需要的能量。由于红细胞担当转运氧的任务,所以红细胞需要稳定地产生还原力来保护细胞膜以避免由于转运氧引起的伤害。一种最常见的遗传病是红细胞中的葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏病。当某种可能破坏红细胞膜的处方药存在于血液中时,就会引起葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏病患者的红细胞裂解,导致贫血病。

(a) 葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏是如何影响红细胞中还原力水平的?为了保护红细胞的完整需要的是哪一种还原力?

(b) 糖酵解在红细胞中起着什么样的作用?

14　柠檬酸循环

葡萄糖经糖酵解生成丙酮酸，第 13 章描述了在无氧条件下丙酮酸经乙醇发酵生成乙醇以及在肌肉组织中经乳酸发酵生成乳酸的代谢过程。但对于在有氧条件下生存的绝大多数真核细胞和许多细菌来说，少量燃料氧化就可获得满足生存的能量。不过燃料也还要进行糖酵解直至丙酮酸，但丙酮酸不再被还原为乳酸或乙醇，而是被氧化成二氧化碳和水。这一需氧的分解代谢过程称为细胞呼吸作用(cellular respiration)，糖酵解只是燃料完全氧化过程的一个阶段。

细胞呼吸作用分为 3 个阶段，在第 1 阶段产能燃料蛋白质、糖和脂肪氧化生成乙酰 CoA；在第 2 阶段乙酰 CoA 经柠檬酸循环氧化为 CO_2，氧化释放的能量以还原型电子载体 NADH 和 $FADH_2$ 形式储存；在第 3 阶段 NADH 和 $FADH_2$ 被氧化，释放的电子经电子传递链传递给 O_2，传递过程中释放的能量经氧化磷酸化过程生成 ATP(图 14.1)。

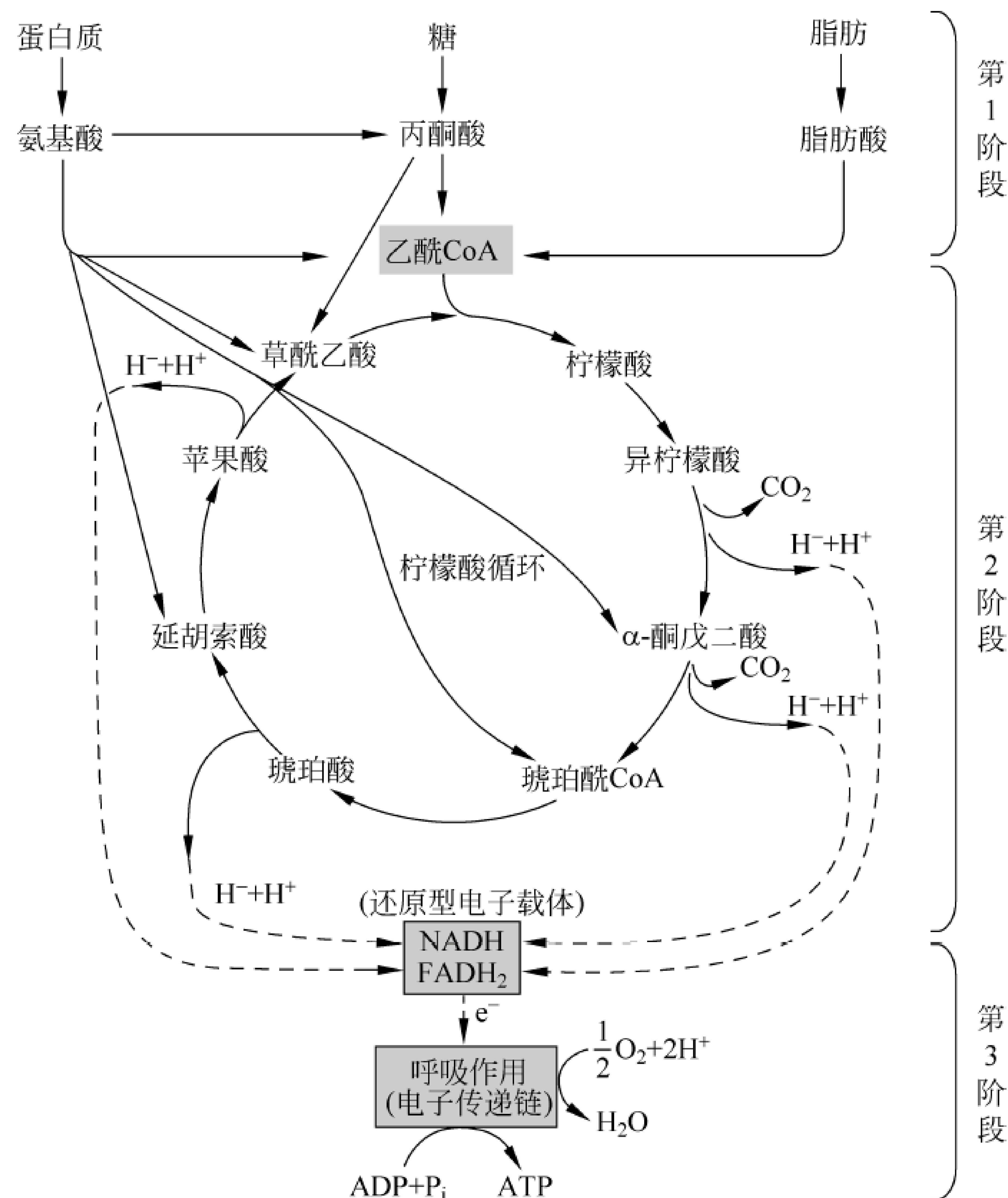


图 14.1　柠檬酸循环在分解代谢中的作用

第 1 阶段：乙酰 CoA 生成；第 2 阶段：乙酰 CoA 氧化；第 3 阶段：电子传递和氧化磷酸化

柠檬酸循环(citric acid cycle)又称为三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TCA 循环),因为循环中存在三羧酸中间产物。该循环是由 H. A. Krebs 首先提出的(1953 年获诺贝尔奖),所以又称为 Krebs 循环。本节首先从细胞呼吸作用第 1 阶段最后的丙酮酸转化为乙酰 CoA 反应开始,然后描述呼吸作用的第 2 阶段乙酰 CoA 进入柠檬酸循环后的分解代谢过程。

14.1 乙酰 CoA 的生成

在细菌细胞中,丙酮酸转化为乙酰 CoA 的反应发生在细胞质,但在真核细胞中,这一转化发生在线粒体(和叶绿体)。由于糖酵解发生在细胞质中,所以丙酮酸首先必须要转运到线粒体(和叶绿体)内。线粒体是由双层膜包围着的一个细胞器,像丙酮酸这样的小分子经膜孔蛋白形成的通道可以通过线粒体外膜,但要穿过内膜进入线粒体内需要靠丙酮酸转运酶(pyruvate translocase)转运。丙酮酸转运酶特异地以与 H^+ 同向转运方式将丙酮酸转运至线粒体内(图 14.2)。

无论是在原核细胞,还是在真核细胞,丙酮酸转化为乙酰 CoA 和 CO_2,都是由丙酮酸脱氢酶复合物(pyzuvate dehydrogenase complex)催化的(图 14.3)。

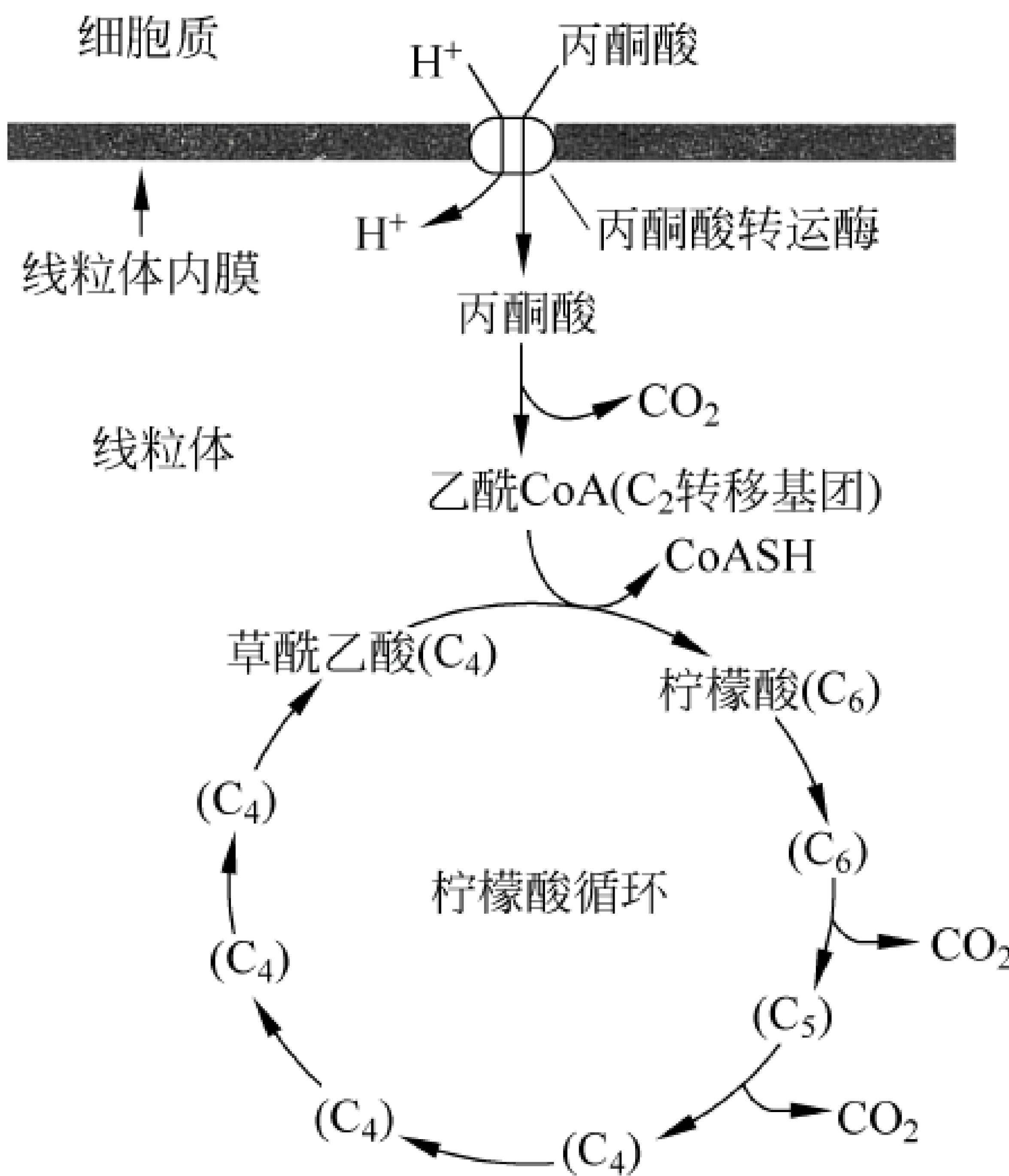


图 14.2 丙酮酸的转运

丙酮酸经丙酮酸转运酶转运到线粒体内

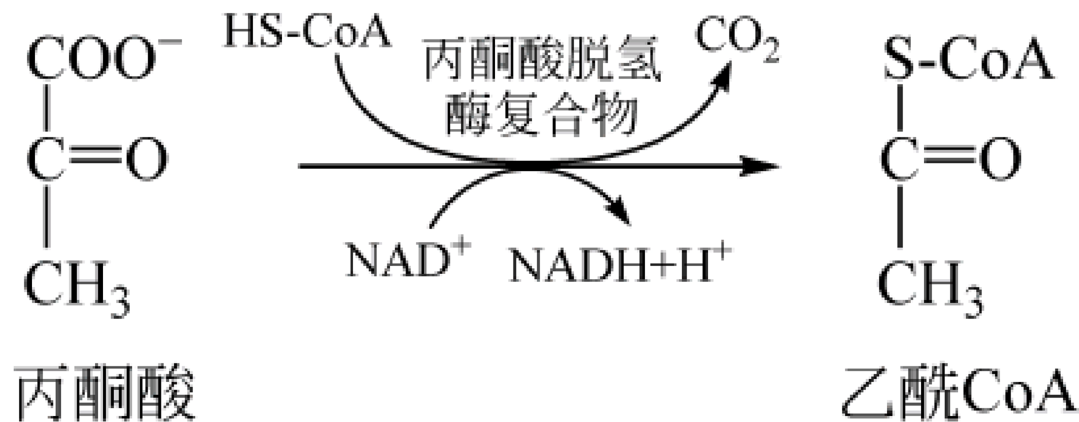


图 14.3 丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应

$\Delta G^{\ominus\prime} = -33.4 kJ/mol$

丙酮酸脱氢酶复合物是个有组织的多酶集合体。复合物中酶分子通过非共价键联系在一起,催化一个连续反应,即酶复合物中一个酶反应中形成的产物立刻被复合物中下一个酶作用。在真核细胞中丙酮酸脱氢酶复合物位于线粒体膜上,由丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)(E_1)、二氢硫辛酰胺转乙酰基酶(dihydrolipoamide acetyltransferase)(E_2)和二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase)(E_3)3 种酶,以及 TPP(焦磷酸硫胺素)、CoASH、硫辛酸、FAD 、NAD^+ 和 Mg^{2+} 6 种辅助因子组成。图 14.4 给出了丙酮酸脱氢酶复合物催化丙酮酸转化为乙酰 CoA 和 CO_2 的反应过程。

如图 14.4 所示,由丙酮酸脱氢酶复合物催化的丙酮酸氧化脱羧涉及 5 步反应。

(1) 在丙酮酸脱氢酶(E_1)(TPP 为辅酶)催化下,TPP 与丙酮酸反应,释放出 CO_2 生成

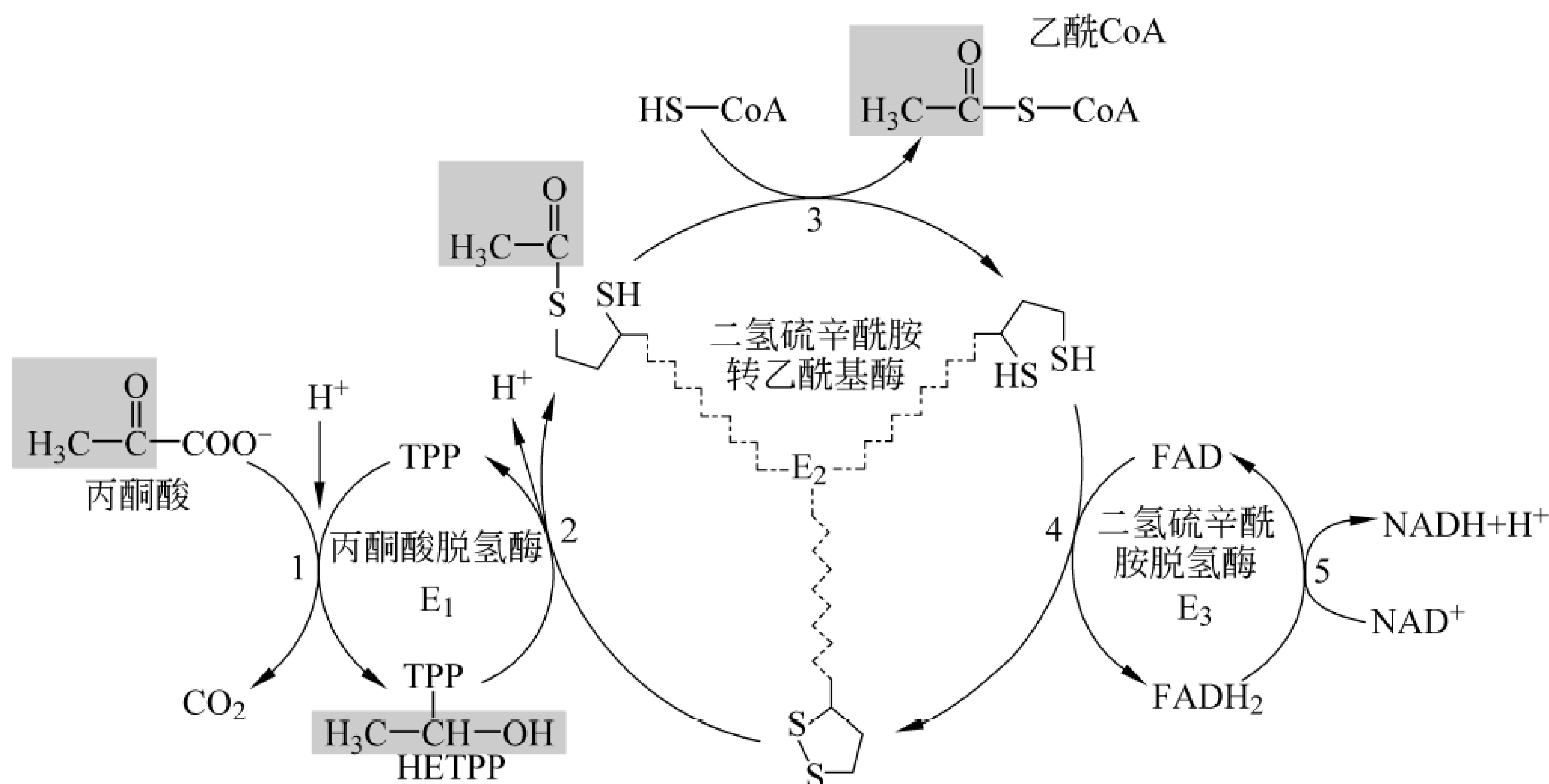


图 14.4 丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应

连接在 E2 的硫辛酰胺像个摆臂一样，将负载的来自丙酮酸脱氢酶活性位点的二碳单位转移给二氢硫辛酰胺乙酰转移酶，然后将携带的氢原子转移给二氢硫辛酰胺脱氢酶。图中 1～5 代表 5 步反应

HETPP(羟乙基焦磷酸硫胺素)。

(2) 也是在 E_1 催化下，乙酰基二碳片段被转移到二氢硫辛酰胺转乙酰基酶(E_2)的组成成分硫辛酰胺上。硫辛酰胺辅基像一个摆动臂在 E_1 和 E_3 的活性部位之间运动。

(3) 在 E_2 催化下，乙酰-二氢硫辛酰胺中的乙酰基转移给 HS-CoA(辅酶 A)。至此，丙酮酸转换为乙酰 CoA 的反应已经完成，为了能够进行下一轮的丙酮酸转换为乙酰 CoA 的反应，必须要将二氢硫辛酰胺转换为硫辛酰胺。

(4) 在二氢硫辛酰胺脱氢酶(E_3)催化下，E_3 的辅基 FAD 使二氢硫辛酰胺氧化重新生成为硫辛酰胺，并生成 $FADH_2$。带有硫辛酰胺的二氢硫辛酰胺转乙酰基酶再参与下一轮反应。

(5) 最后，还是在 E_3 催化下，NAD^+ 被 $FADH_2$ 氧化还原为 NADH(H^+)，同时生成 E_3-FAD。

三价砷化物亚砷酸盐和有机砷化物易于与巯基化合物反应，特别是与二巯基化合物，例如二氢硫辛酰胺反应，形成二配位加合物(图 14.5)。

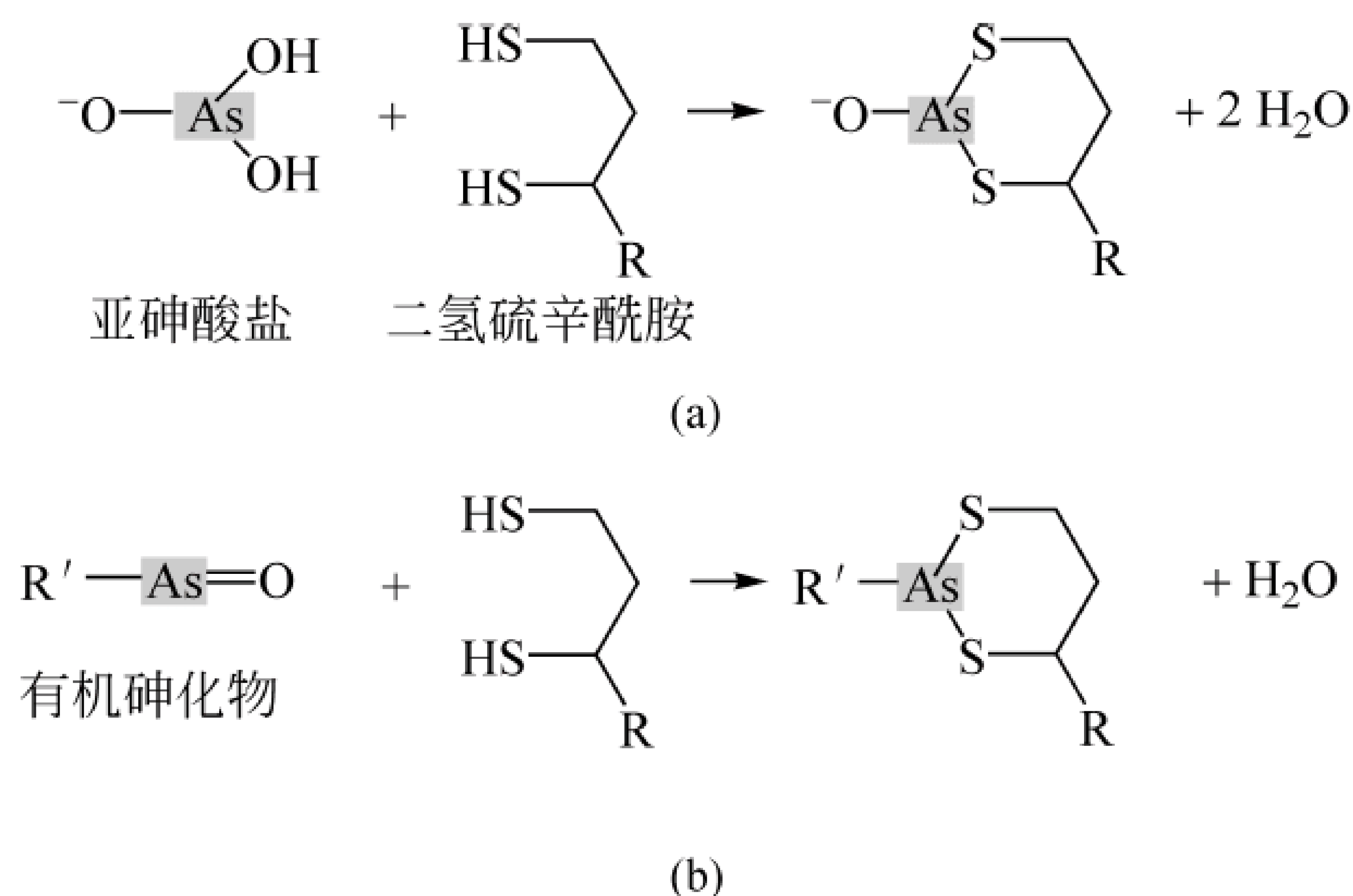


图 14.5 砷化合物与二氢硫辛酰胺反应

(a) 亚砷酸盐与二氢硫辛酰胺的反应；(b) 有机砷化物与二氢硫辛酰胺的反应

砷化物对硫辛酰胺基团的这个共价修饰使 E_1—E_2—E_3 多酶复合物失活,包括丙酮酸脱氢酶复合物和柠檬酸循环中 α-酮戊二酸脱氢酶复合物,因此也就抑制了细胞呼吸作用。

14.2 柠檬酸循环

丙酮酸转化为乙酰 CoA 的反应实际上不是柠檬酸循环中的反应,而是糖酵解和柠檬酸循环之间的桥梁。此外脂肪和蛋白质降解过程中也生成乙酰 CoA,这些乙酰 CoA 经柠檬酸循环进一步被氧化。

图 14.6 给出了柠檬酸循环的 8 步酶促反应,乙酰 CoA 被氧化为 CO_2 的同时,释放的大部分能量以还原型电子载体 NADH 和 QH_2 形式储存。

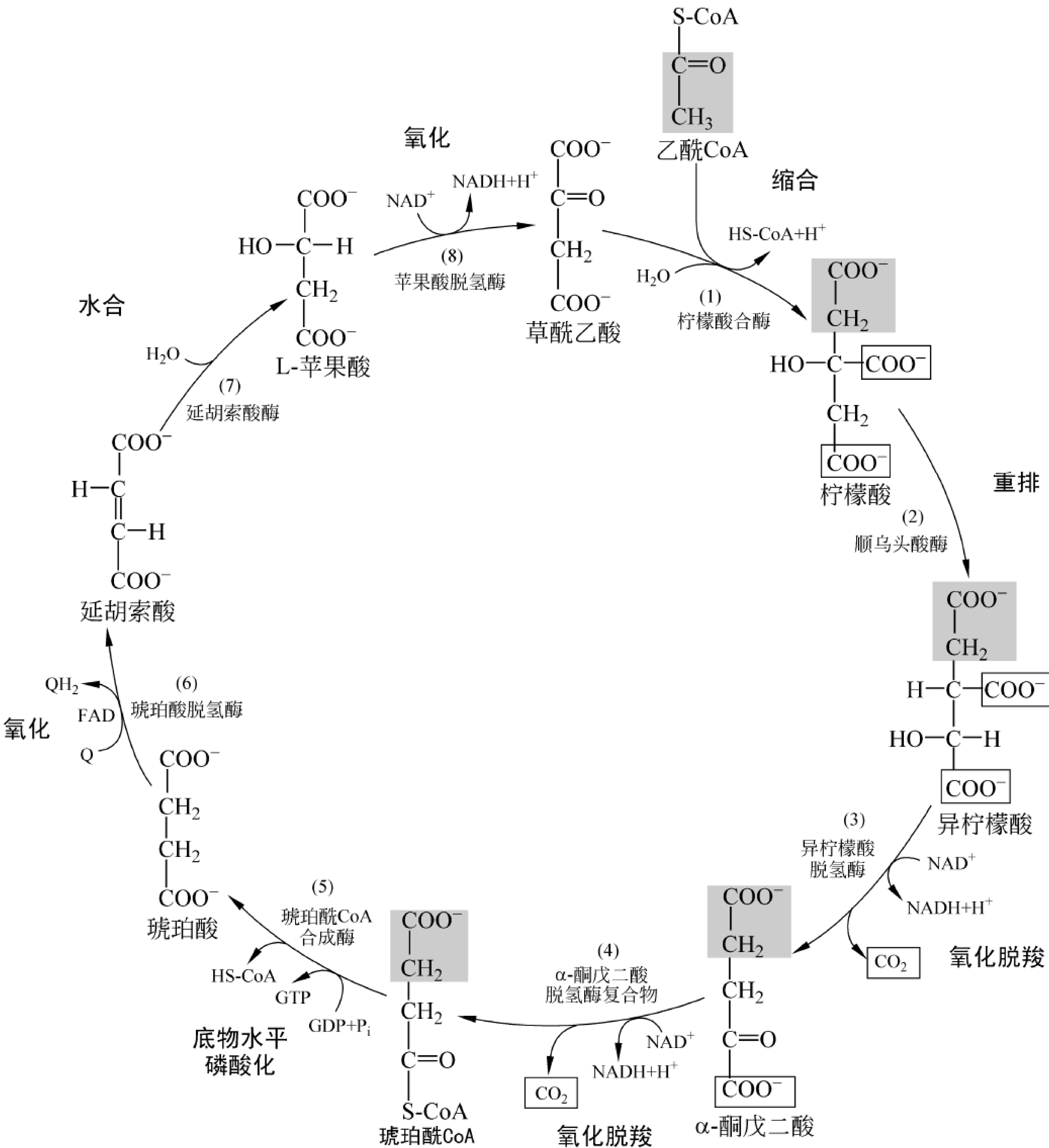


图 14.6 柠檬酸循环

柠檬酸阴影覆盖部分为来自乙酰 CoA 的乙酰基,2 个方框内的—COO^- 来自草酰乙酸

以下按照图 14.6 中反应序号，对各个反应进行具体描述。

(1) 缩合：乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合形成柠檬酸

这是柠檬酸循环的第一个反应，在柠檬酸合酶(citrate synthase)催化下，乙酰 CoA 与草酰乙酸缩合生成柠檬酸，释放出 CoASH(图 14.7)。反应不需要输入 ATP，因为乙酰 CoA 是高能化合物硫酯，水解释放能量驱动反应进行。

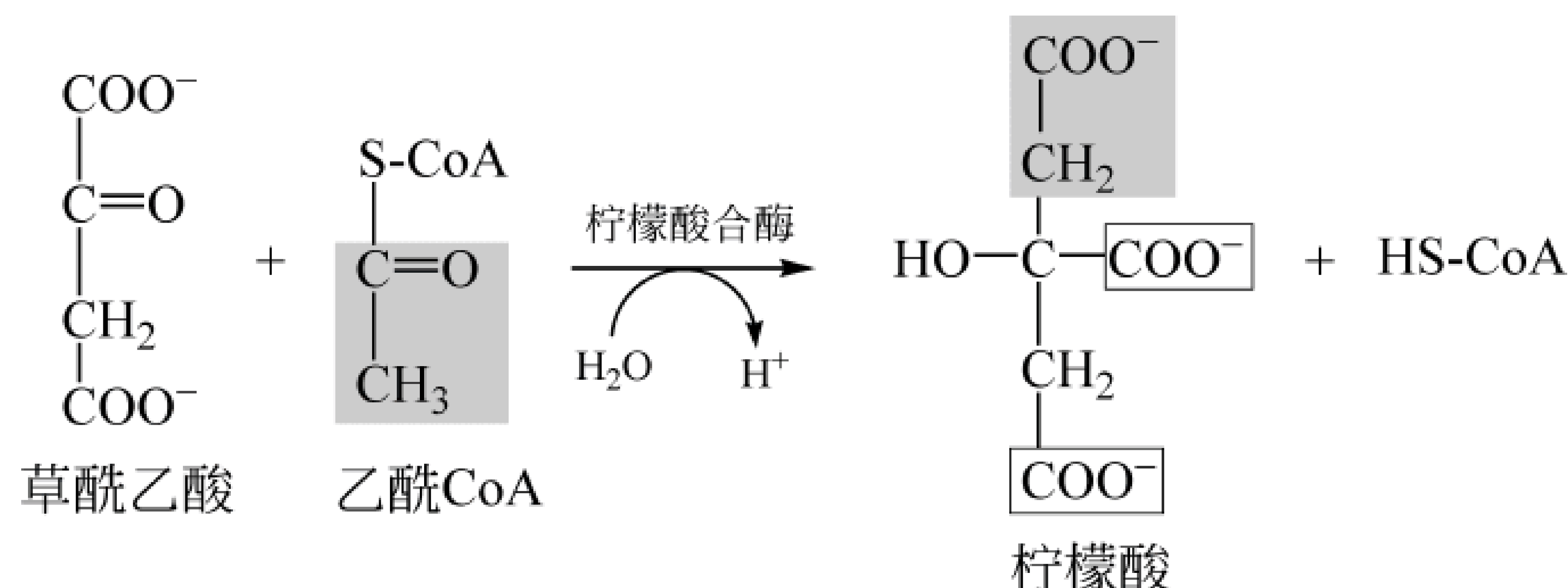


图 14.7　柠檬酸合酶反应

阴影部分来自乙酰 CoA 的乙酰基，2 个方框内的—COO^- 来自草酰乙酸

(2) 重排：柠檬酸异构化为异柠檬酸

在顺乌头酸酶(aconitase)催化下，经过一个中间体顺乌头酸(*cis*-aconitate)，柠檬酸转换为异柠檬酸(isocitrate)(图 14.8)。

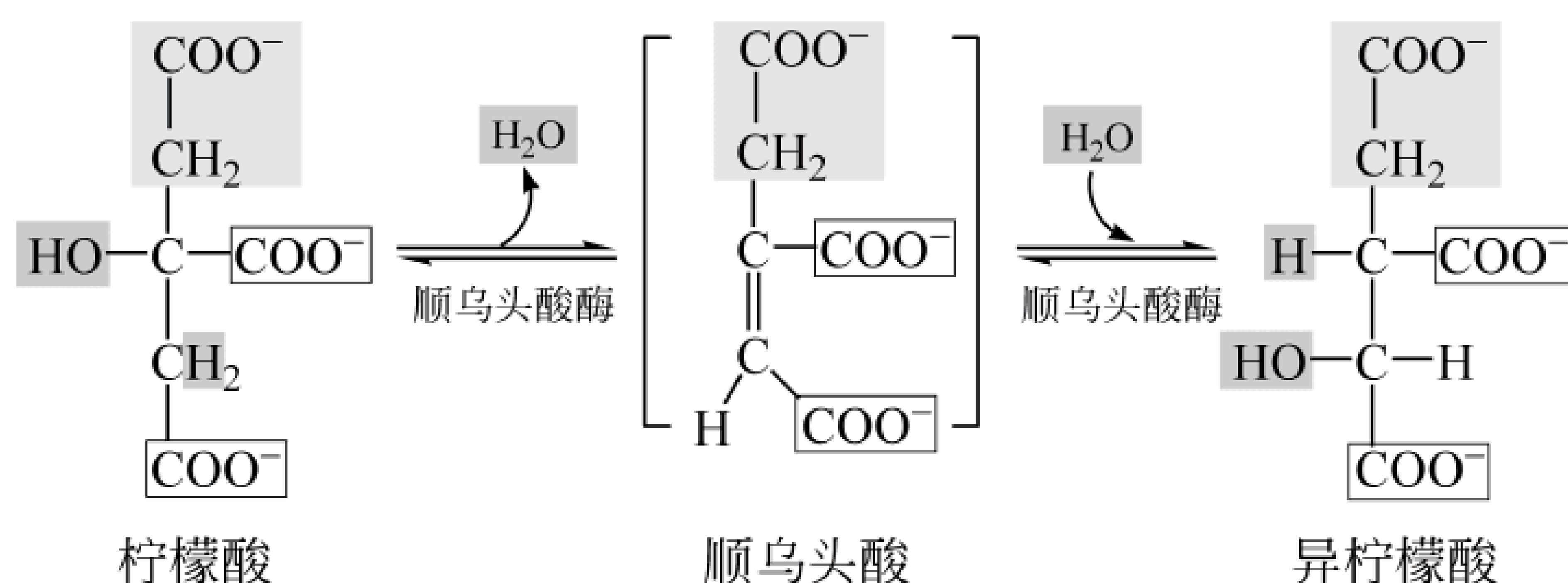


图 14.8　顺乌头酸酶反应

柠檬酸由顺乌头酸酶催化脱水形成含有 C=C 双键的顺乌头酸，顺乌头酸仍保留在酶活性部位。还是在顺乌头酸酶催化下，以立体特异方式将 OH^- 和 H^+ 添加到顺乌头酸的 C=C 双键上，只生成图 14.8 给出的那种立体异构体形式的异柠檬酸。

从化学结构看柠檬酸是个对称分子，酶不能区分上半部分和下半部分的—CH_2COO^-，所以 OH^- 也可以加到来自乙酰基的—CH_2—的 C 上，但经核素标记实验验证，产物当中只有上述那种异柠檬酸。后来 Alexander Ogston 给出了比较清晰的解释，柠檬酸虽然不存在手性中心，但顺乌头酸酶的不对称活性部位能够识别柠檬酸两端的—CH_2COO^-，结果发生了不对称反应。为此他提出了柠檬酸像图 14.9 那样的通过三点附着方式与顺乌头酸酶发生不对称相互作用的模式，在这种模式中，2 个—CH_2COO^- 基团中只有一个与活性部位结合，即下半部分的—CH_2COO^- 基团参加反应，生成异柠檬酸。

像柠檬酸那样虽然不含有手性中心，但具有与酶进行不对称反应的有机分子称为前手性(prochiral)分子。

顺乌头酸酶催化的反应是可逆反应，虽然平衡时异柠檬酸只在柠檬酸和异柠檬酸混合

物中占 10%,但由于异柠檬酸很快作为下一步反应的底物被消耗掉,所以反应仍可向生成异柠檬酸方向进行。

剧毒物氟乙酸(fluoroacetate)在细胞内可以转化为氟乙酰 CoA,在柠檬酸合酶催化下它可与草酰乙酸缩合生成类似于柠檬酸的氟柠檬酸。氟柠檬酸是顺乌头酸酶的一个很强的抑制剂,所以氟乙酸会终止经柠檬酸循环的有氧代谢(图 14.10)。以前人们常利用氟乙酸这一致死特性将氟乙酸做成灭鼠药。

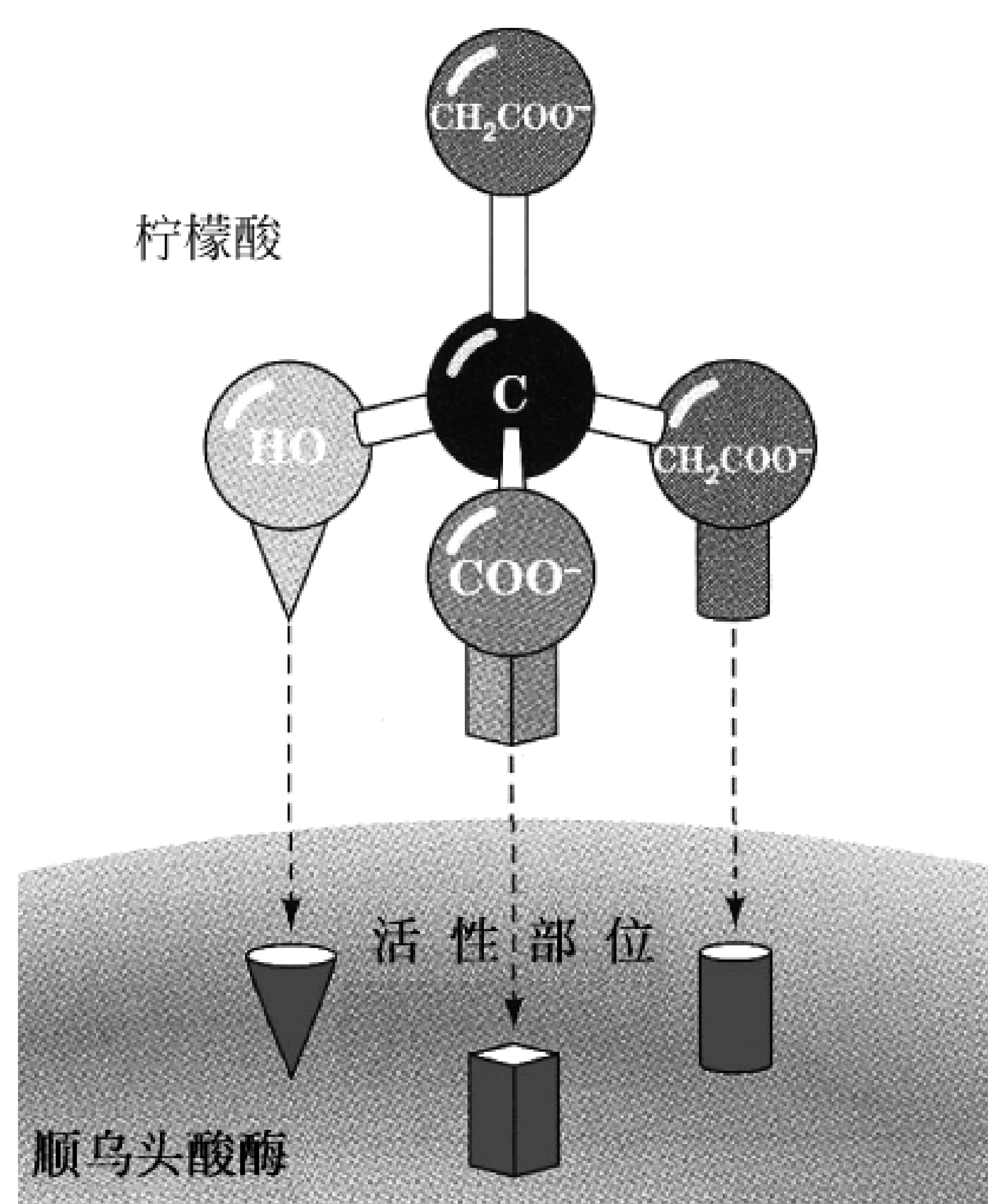


图 14.9 柠檬酸通过三点附着与酶结合

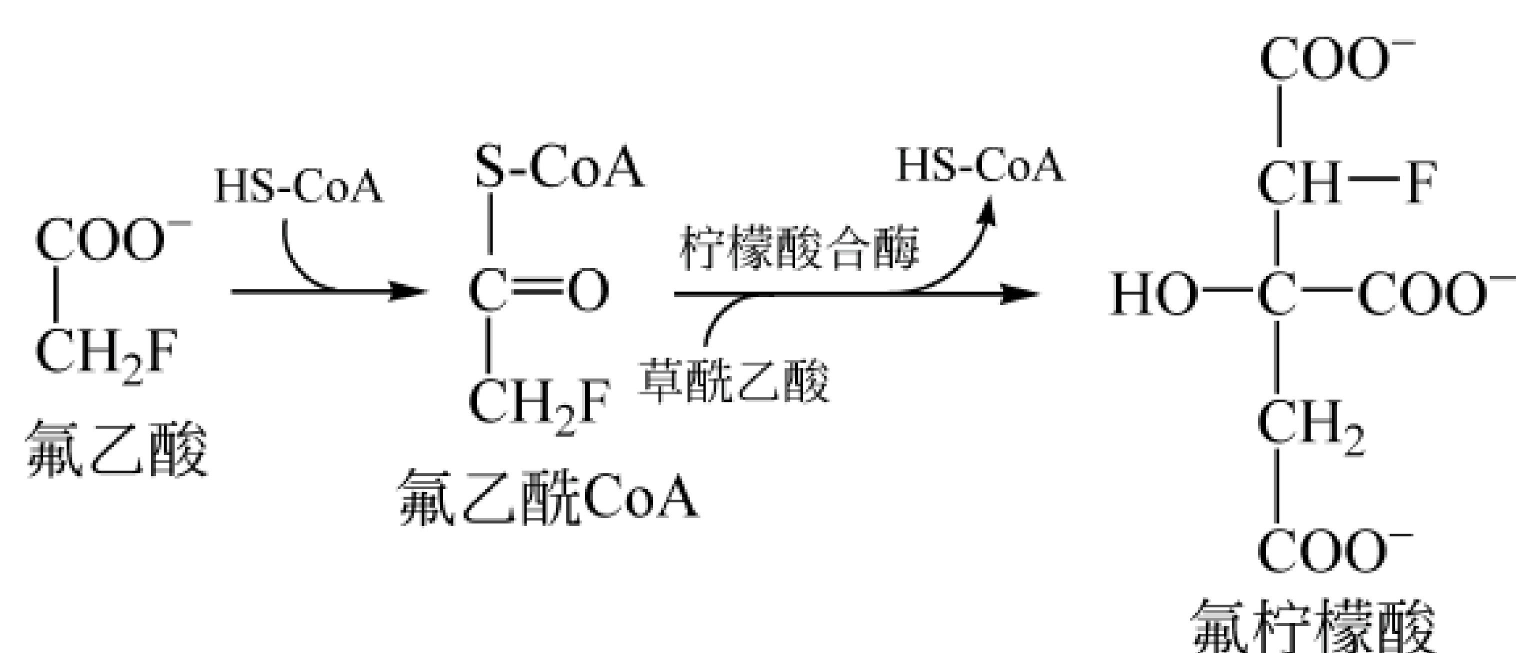


图 14.10 氟柠檬酸的合成

(3) 氧化脱羧:异柠檬酸氧化生成 α-酮戊二酸和 CO_2

这一步反应是柠檬酸循环中第 1 个氧化还原反应,由异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase)催化,NAD^+ 作为酶的辅酶。异柠檬酸脱氢使 NAD^+ 还原为 $NADH+H^+$ 的同时,生成一个不稳定的 β-酮酸草酰琥珀酸,草酰琥珀酸经非酶催化的 β 脱羧作用脱去 CO_2,生成 α-酮戊二酸,反应是不可逆的(图 14.11)。

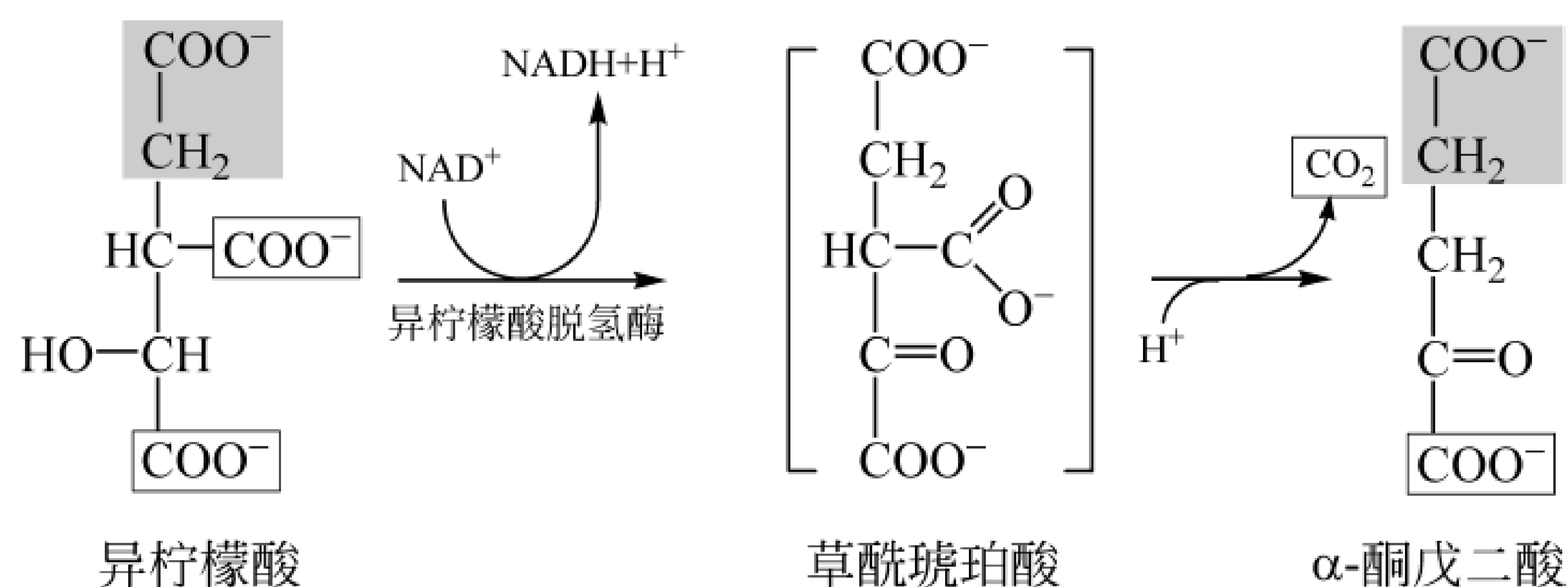


图 14.11 异柠檬酸脱氢酶反应

脱去的 CO_2 是来自原来草酰乙酸的—COO^-

(4) 氧化脱羧:α-酮戊二酸氧化脱羧生成琥珀酰 CoA

像丙酮酸一样,α-酮戊二酸也是一个酮酸,氧化脱羧反应非常类似丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应。反应由 α-酮戊二酸脱氢酶复合物(α-ketoglutarate dehydrogenase complex)催化,产物琥珀酰 CoA 同样是一个高能的硫酯,这步反应是柠檬酸循环中第 2 个氧化还原反应(图 14.12)。

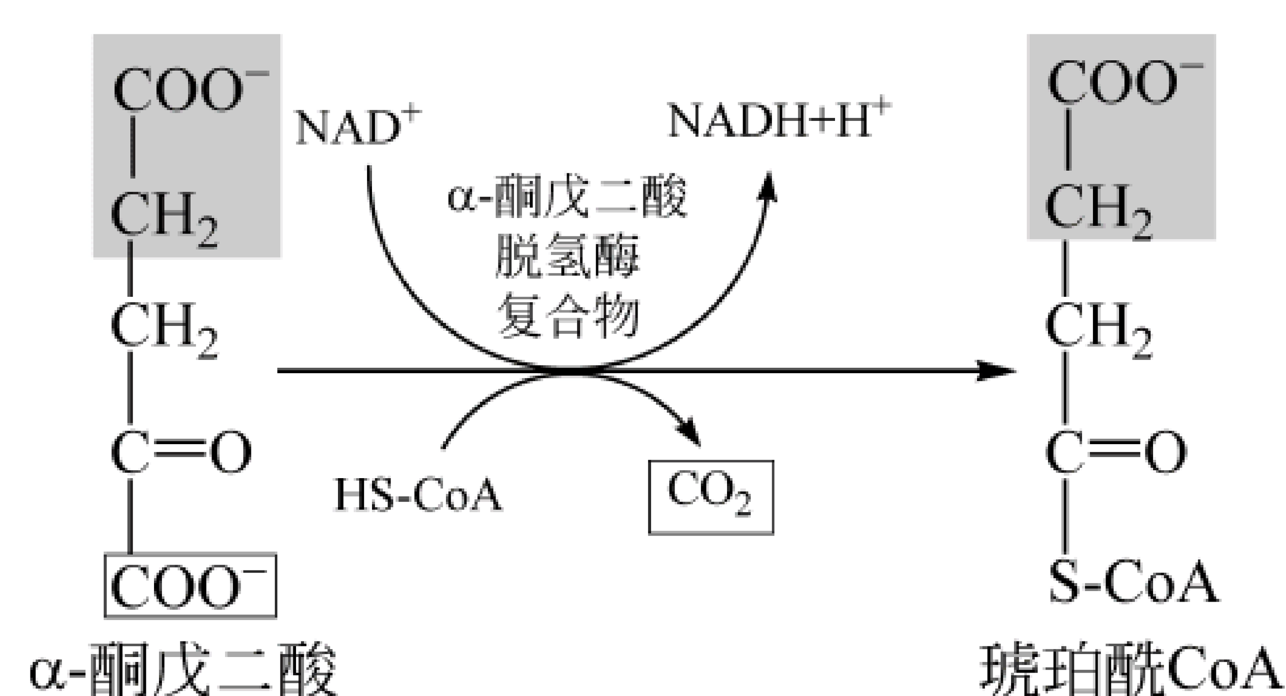


图 14.12 α-酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应

脱去的 CO_2 同样来自原来草酰乙酸的—COO^-

α-酮戊二酸脱氢酶复合物类似于丙酮酸脱氢酶复合物，涉及同样的辅助因子（TPP、CoASH、硫辛酸、FAD 、NAD^+ 和 Mg^{2+}），反应机制也很类似。α-酮戊二酸脱氢酶复合物包括 α-酮戊二酸脱氢酶（E_1，含有 TPP）、二氢硫辛酰胺转琥珀酰基酶（E_2，含有硫辛酰胺）和二氢硫辛酰胺脱氢酶（E_3，含有黄素蛋白）。

循环进行到这步反应为止，生成 2 分子 CO_2，被氧化的碳原子数目刚好等于进入柠檬酸循环的碳原子数（乙酰 CoA 分子中乙酰基的 2 个碳）。在循环的后 4 个反应中，琥珀酰 CoA 的四碳琥珀酰基被转换回草酰乙酸。

（5）底物水平磷酸化：琥珀酰 CoA 的硫酯键水解生成琥珀酸和 CoA-SH

琥珀酰 CoA 合成酶（succinyl-CoA synthetase）（或称琥珀酸硫激酶）催化琥珀酰 CoA 的硫酯键水解生成琥珀酸和 CoA-SH，同时 GDP 磷酸化生成 GTP（图 14.13）。琥珀酰 CoA 合成酶是根据生成琥珀酰 CoA 逆反应命名的。

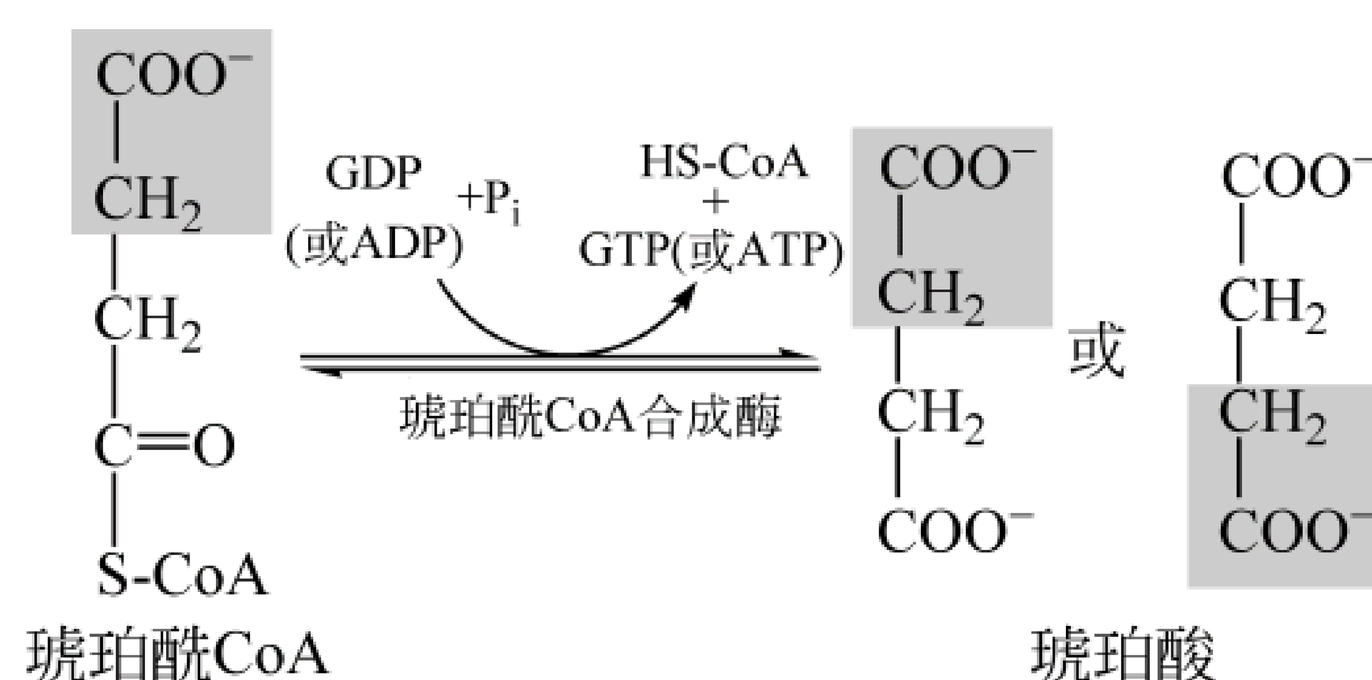


图 14.13 琥珀酰 CoA 合成酶反应

虽然 GDP 磷酸化生成 GTP 反应是个吸能反应（相当于 ADP 生成 ATP 反应，$\Delta G^{\ominus\prime}=30.5\text{kJ/mol}$），但由于琥珀酰 CoA 的硫酯键水解的自由能为 $\Delta G^{\ominus\prime}=-33.4\text{kJ/mol}$，所以总反应 $\Delta G^{\ominus\prime}=-3.3\text{kJ/mol}$，仍有利于反应正向进行。在哺乳动物中合成的是 GTP，而在植物和一些细菌中合成的是 ATP。这个反应类似于糖酵解中的甘油磷酸激酶和丙酮酸激酶催化的反应，是柠檬酸循环中惟一一步底物水平磷酸化反应。生成的 GTP 的 γ-磷酰基通过核苷二磷酸激酶可以被转移到 ADP 上生成 ATP。

（6）氧化：琥珀酸脱氢生成延胡索酸

这是柠檬酸循环中第 3 步氧化还原反应，带有辅基 FAD 的琥珀酸脱氢酶（En-FAD）复合物（succinate dehydrogense complex）催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸（反丁烯二酸），同时使 En-FAD 还原为 En-$FADH_2$。然后 En-$FADH_2$ 被辅酶 Q 氧化重新生成 En-FAD，Q 则被

还原为 QH_2(图 14.14)。真核生物琥珀酸脱氢酶复合物内嵌于线粒体内膜中,柠檬酸循环中其他酶都位于线粒体基质中。在原核生物中,该酶内嵌在质膜中,其他酶位于胞质溶胶中。

底物类似物丙二酸是琥珀酸脱氢酶的一个竞争性抑制剂(见第 4 章酶)。在分离的线粒体或细胞匀浆液的实验中加入丙二酸后,会引起琥珀酸、α-酮戊二酸和柠檬酸的堆积,这是研究柠檬酸循环反应顺序的早期证据。

(7) 水合:延胡索酸水合生成 *L*-苹果酸

延胡索酸酶(fumarase)[也称为延胡索酸水合酶(fumarate hydratase)]催化延胡索酸反式双键水合,生成 *L*-苹果酸,反应是可逆的(图 14.15)。

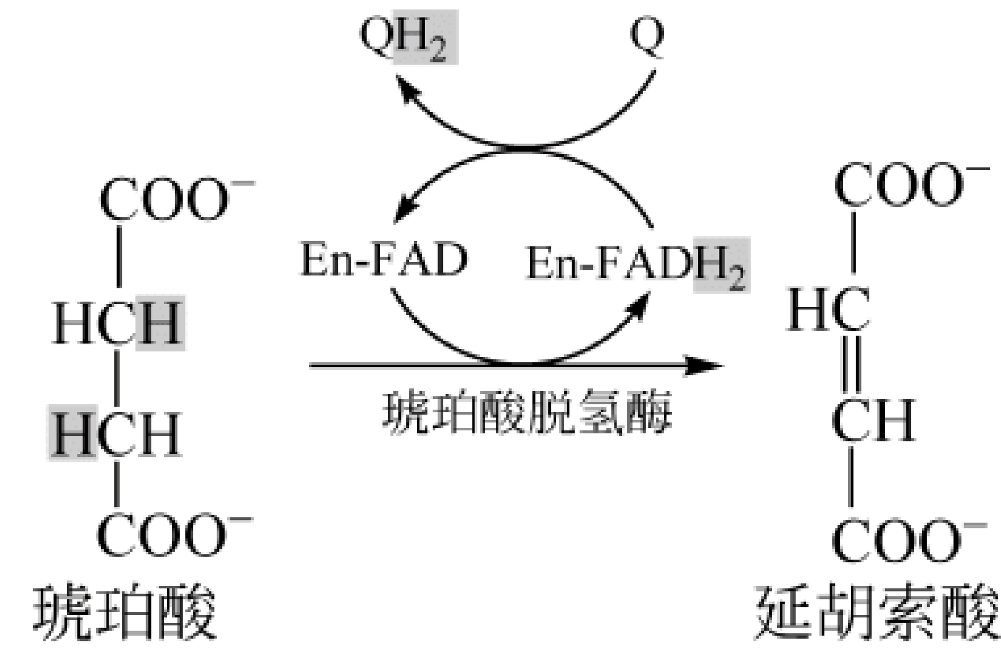


图 14.14 琥珀酸脱氢酶反应

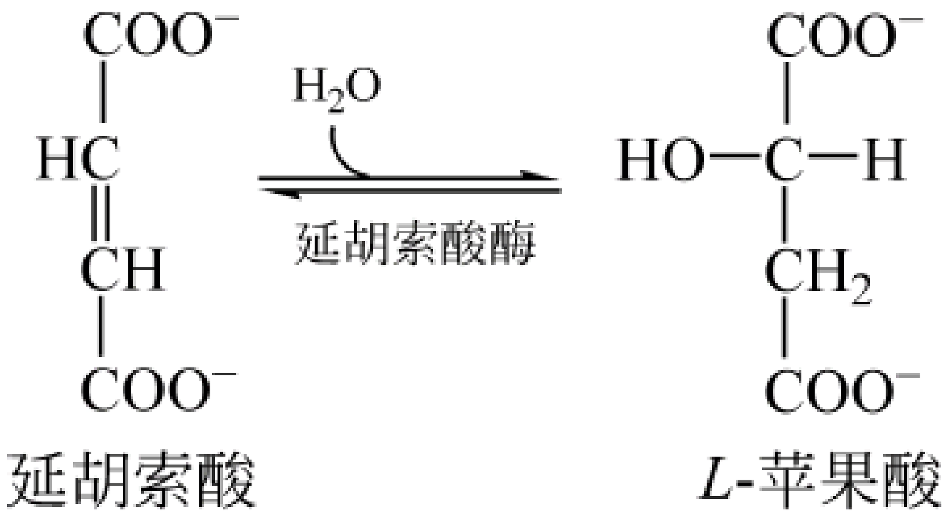


图 14.15 延胡索酸酶反应

(8) 氧化:苹果酸氧化重新生成草酰乙酸,完成一轮柠檬酸循环

这是柠檬酸循环最后一个反应,也是循环中第 4 步氧化还原反应。*L*-苹果酸在以 NAD^+ 为辅酶的苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)催化下氧化生成草酰乙酸,同时 NAD^+ 被还原生成 NADH,反应是可逆的(图 14.16)。

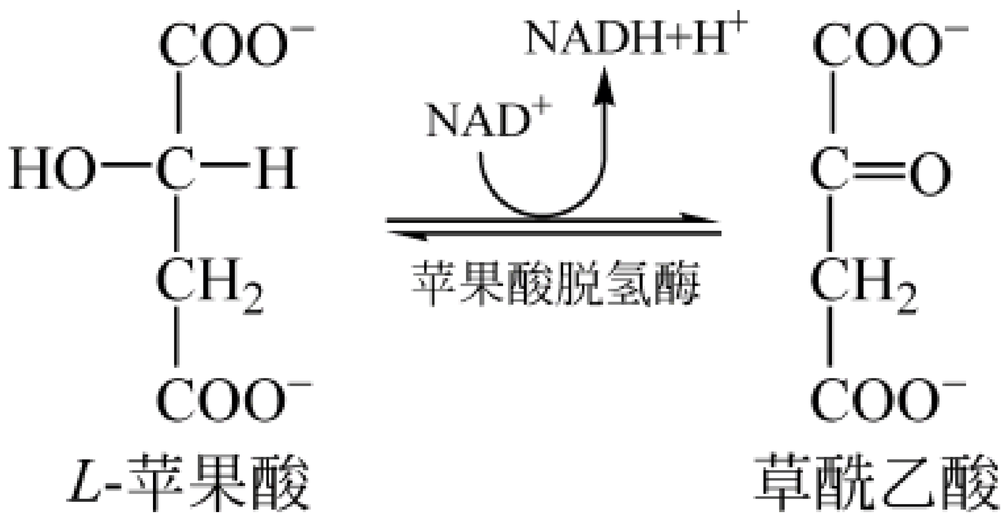


图 14.16 苹果酸脱氢酶反应

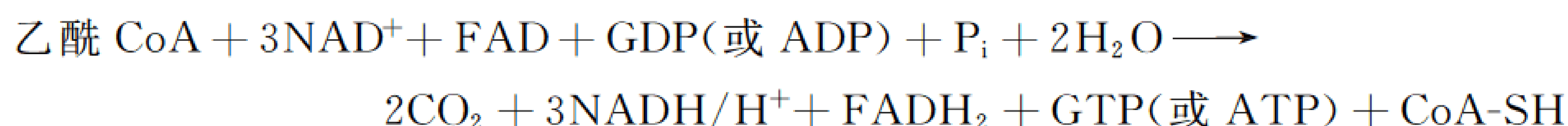
表 14.1 给出了柠檬酸循环各步反应的 $\Delta G^{\ominus\prime}$ 和 ΔG。从 $\Delta G^{\ominus\prime}$ 值看有些反应是吸能反应,但据已知体内反应物浓度计算的 ΔG 大都为负值或零。

表 14.1 柠檬酸循环各步反应的 $\Delta G^{\ominus\prime}$ 和 ΔG

	反　应	$\Delta G^{\ominus\prime}$/(kJ/mol)	ΔG/(kJ/mol)
(1)	乙酰 CoA+草酰乙酸+H_2O ⟶ 柠檬酸+CoA-SH	−31.4	−53.9
(2)	柠檬酸 ⟶ 异柠檬酸	+6.7	+0.8
(3)	异柠檬酸+NAD^+ ⟶ α-酮戊二酸+NADH+CO_2+H^+	−8.4	−17.5
(4)	α-酮戊二酸+NAD^++CoA-SH ⟶ 琥珀酰 CoA+NADH+CO_2+H^+	−30.0	−43.9
(5)	琥珀酰 CoA+GDP+P_i ⟶ 琥珀酸+GTP+CoA-SH	−3.3	≈0
(6)	琥珀酸+FAD ⟶ 延胡索酸+$FADH_2$	+0.4	≈0
(7)	延胡索酸+H_2O ⟶ *L*-苹果酸	−3.8	≈0
(8)	*L*-苹果酸+NAD^+ ⟶ 草酰乙酸+NADH+H^+	+29.7	≈0

柠檬酸循环从二碳片段(乙酰 CoA)与一个四碳受体(草酰乙酸)缩合生成六碳化合物柠檬酸开始,进一步代谢后,来自草酰乙酸中的两个碳以两个 CO_2 形式释放掉。一轮循环发生了 4 次氧化反应,其中 3 次 NAD^+ 作为电子受体,另外一次是酶结合的 FAD(然后电子转移给辅酶 Q)。循环中还发生了一个底物水平磷酸化反应,直接生成了与 ATP 等价的

GTP。参与一轮柠檬酸循环的 8 个反应的总的化学方程式可表示为：



$$\text{乙酰 CoA} + 3NAD^{+} + FAD + GDP(\text{或 } ADP) + P_i + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH/H^{+} + FADH_2 + GTP(\text{或 } ATP) + CoA\text{-}SH$$

如果考虑到丙酮酸脱氢酶反应和一个葡萄糖分子产生两个丙酮酸，可以将葡萄糖经糖酵解和柠檬酸的分解代谢的反应式表示为：



$$\text{葡萄糖} + 10NAD^{+} + 2FAD + 4ADP + 4P_i + 2H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 10NADH/H^{+} + 2FADH_2 + 4ATP$$

每分子葡萄糖产生 10mol NADH，其中 2mol 产生于胞质溶胶中甘油醛脱氢酶催化反应。由反应直接产生 4molATP(其中 2mol 来自糖酵解)，大多数 ATP 都来自于葡萄糖氧化产物富含能量的 NADH 和 $FADH_2$ 的再氧化。当电子由这些还原型载体逐步传递给分子氧，并与 ADP 磷酸化生成 ATP 偶联时(16 章详细描述)，每摩[尔]NADH 再氧化可产生 2.5mol ATP，而每摩[尔]$FADH_2$ 产生 1.5mol ATP。产生于胞质溶胶的 2mol NADH 因传递到线粒体的途径不同可能会产生 1.5mol 或 2.5mol ATP。因此每摩尔葡萄糖氧化为 CO_2 和 H_2O 可生成约 30mol 或 32mol ATP。

14.3　柠檬酸循环的调控

柠檬酸循环在细胞代谢中占据着代谢的中心位置，所以受到严密的调控。柠檬酸循环的调控包括丙酮酸转化为乙酰 CoA 反应以及柠檬酸循环本身的几个关键酶的调控(图 14.17)。

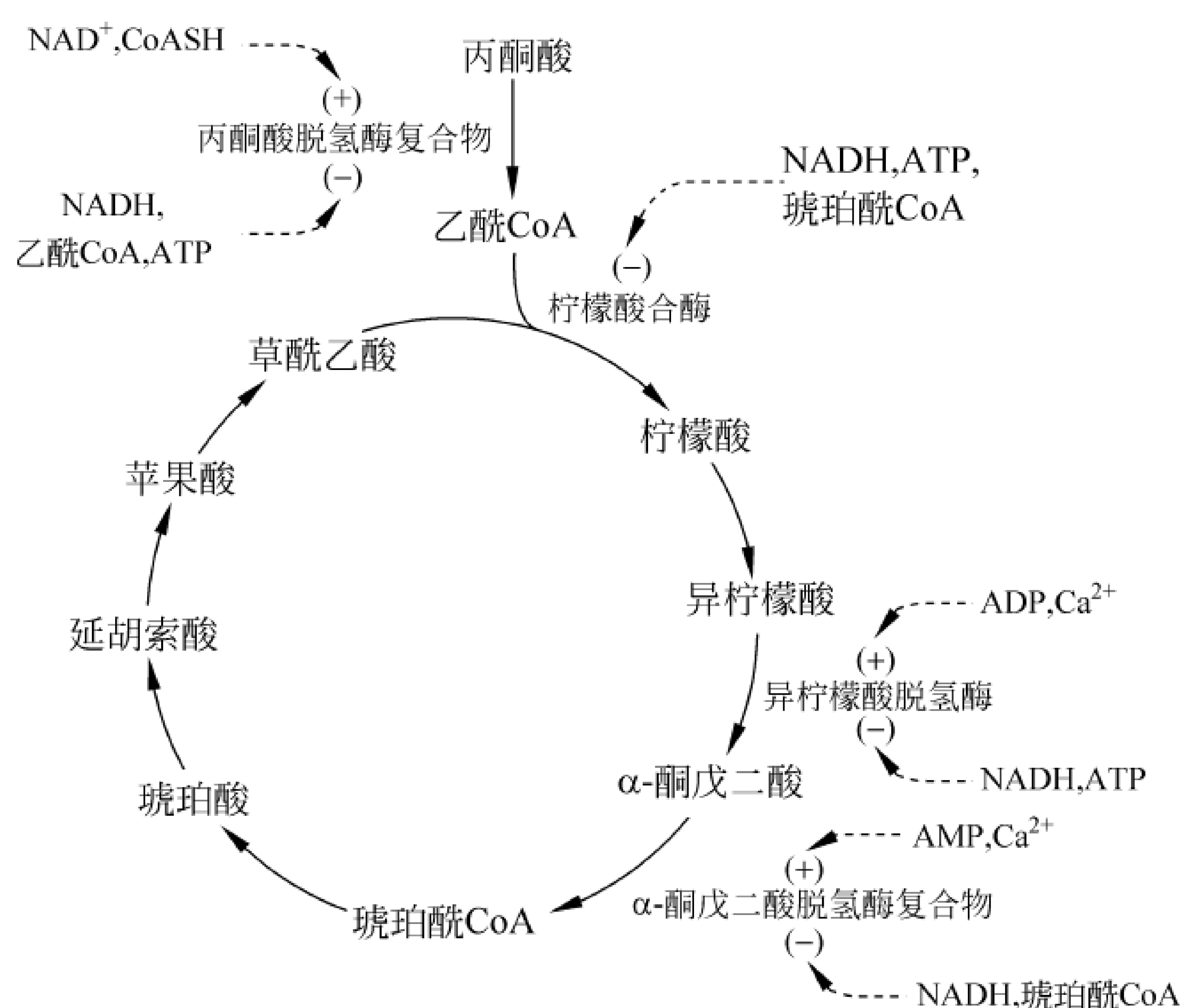


图 14.17　柠檬酸循环的调控

(1) 丙酮酸脱氢酶复合物的调控

前面已经提到丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应并不真正属于柠檬酸循环，但对于葡萄糖来说该反应却是进入柠檬酸循环的必经之路。丙酮酸脱氢酶复合物存在别构和共价修饰两种调控机制。乙酰 CoA、NADH 及 ATP 是丙酮酸脱氢酶复合物的强烈抑制剂，NAD^{+} 和 CoASH 则是丙酮酸脱氢酶复合物的别构激活剂。另外，丙酮酸脱氢酶复合物还受到共价

修饰调节,丙酮酸脱氢酶激酶催化复合物中的丙酮酸脱氢酶(E_1)磷酸化,导致该酶复合物失去活性,而丙酮酸脱氢酶磷酸酶催化 E_1 去磷酸,激活丙酮酸脱氢酶复合物(见第4章)。

(2) 柠檬酸循环的调控

在柠檬酸循环中存在着3个不可逆反应:由柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和α-酮戊二酸脱氢酶复合物分别催化的反应,在一定条件下都可能成为循环的限速步骤。在由柠檬酸合酶催化的第一个反应中,体外实验表明会受到NADH、ATP和琥珀酰CoA的抑制,但在体内的抑制机制还没有确定。

哺乳动物的异柠檬酸脱氢酶受到ADP和 Ca^{2+} 的别构激活,而受到NADH和ATP的抑制,所以高比率的 NAD^+/NADH和ADP/ATP会刺激异柠檬酸脱氢酶和柠檬酸循环的活性。而在细菌中,异柠檬酸脱氢酶受到共价修饰调节,二聚体酶的每个亚基上的Ser残基被一种蛋白激酶磷酸化后,导致异柠檬酸脱氢酶失活。有趣的是同一蛋白激酶分子中的另一具有磷酸酶活性的结构域可以催化磷酸Ser去磷酸,恢复异柠檬酸脱氢酶活性。

α-酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应类似于丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应,但它们的调节特征却完全不同。α-酮戊二酸脱氢酶复合物的调节与激酶和磷酸酶没有关系,主要激活剂是 Ca^{2+},Ca^{2+} 与复合物中的α-酮戊二酸脱氢酶结合,降低了酶对α-酮戊二酸的 K_m 值,导致琥珀酰CoA形成速度增加。在体外实验中,NADH和琥珀酰CoA是α-酮戊二酸脱氢酶复合物的抑制剂,但是否在活细胞内具有重要的调节作用还没有确定。

14.4 柠檬酸循环——两用代谢途径

在代谢导论中看到柠檬酸循环是有氧代谢的枢纽,糖、脂肪和氨基酸的有氧分解代谢都汇集在柠檬酸循环的反应中,同时柠檬酸循环的中间代谢物又是许多生物分子合成的前体(图14.18)。因此,柠檬酸循环既是分解代谢途径,又是合成代谢途径,可以说是分解、合成两用代谢途径。

就像图14.18表示的那样,柠檬酸、α-酮戊二酸、琥珀酰CoA和草酰乙酸都直通生物合成途径。例如在脂肪组织,柠檬酸由线粒体运输到胞质溶胶后,经裂解可生成生物合成脂肪酸和固醇分子的前体乙酰CoA。丙酮酸经转氨反应可生成丙氨酸,α-酮戊二酸可以转换成谷氨酸,谷氨酸又作为其他氨基酸或嘌呤的前体。琥珀酰CoA可以与甘氨酸缩合生成卟啉。草酰乙酸可以脱羧生成磷酸烯醇式丙酮酸,后者既可作为糖合成的前体,又可衍生其他氨基酸。草酰乙酸还可经转氨生成天冬氨酸,可用于嘧啶、尿素等化合物的合成。

柠檬酸循环的中间代谢物被用于其他生物分子的合成,势必减少它在循环中的浓度,影响循环的正常进行,所以要通过添补反应(anaplerotic reaction)来补充减少的代谢物。由于代谢是循环的,所以补充循环内的任一个中间代谢物都会使循环中所有其他中间代谢物的浓度增大。

有3个主要的添补反应:第1个是由丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)(生物素作辅基)催化的由丙酮酸羧化生成草酰乙酸的反应;第2个是发生在许多植物、酵母和细菌中,由磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEP羧化酶)(生物素作辅基)催化由磷酸烯醇式丙酮酸生成草酰乙酸的反应;第3个是广泛存在于原核和真核生物中由苹果酸酶催化的由丙酮酸生成苹果酸的反应(图14.19)。

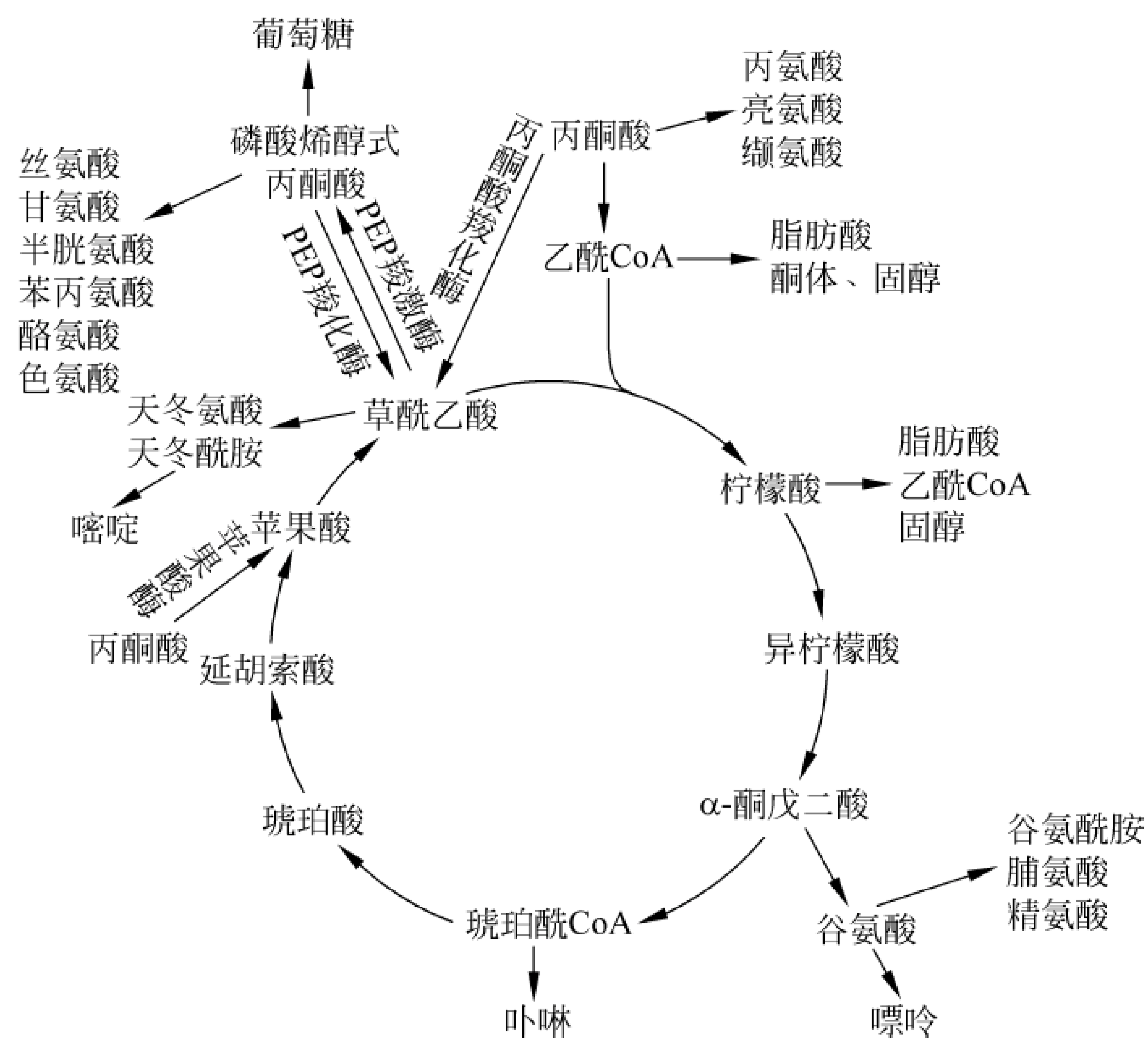


图 14.18　柠檬酸循环的两用代谢功能

柠檬酸循环中间代谢物是许多生物分子合成的前体，其中丙酮酸羧化酶、PEP 羧化酶和苹果酸酶催化的反应是柠檬酸循环的添补反应

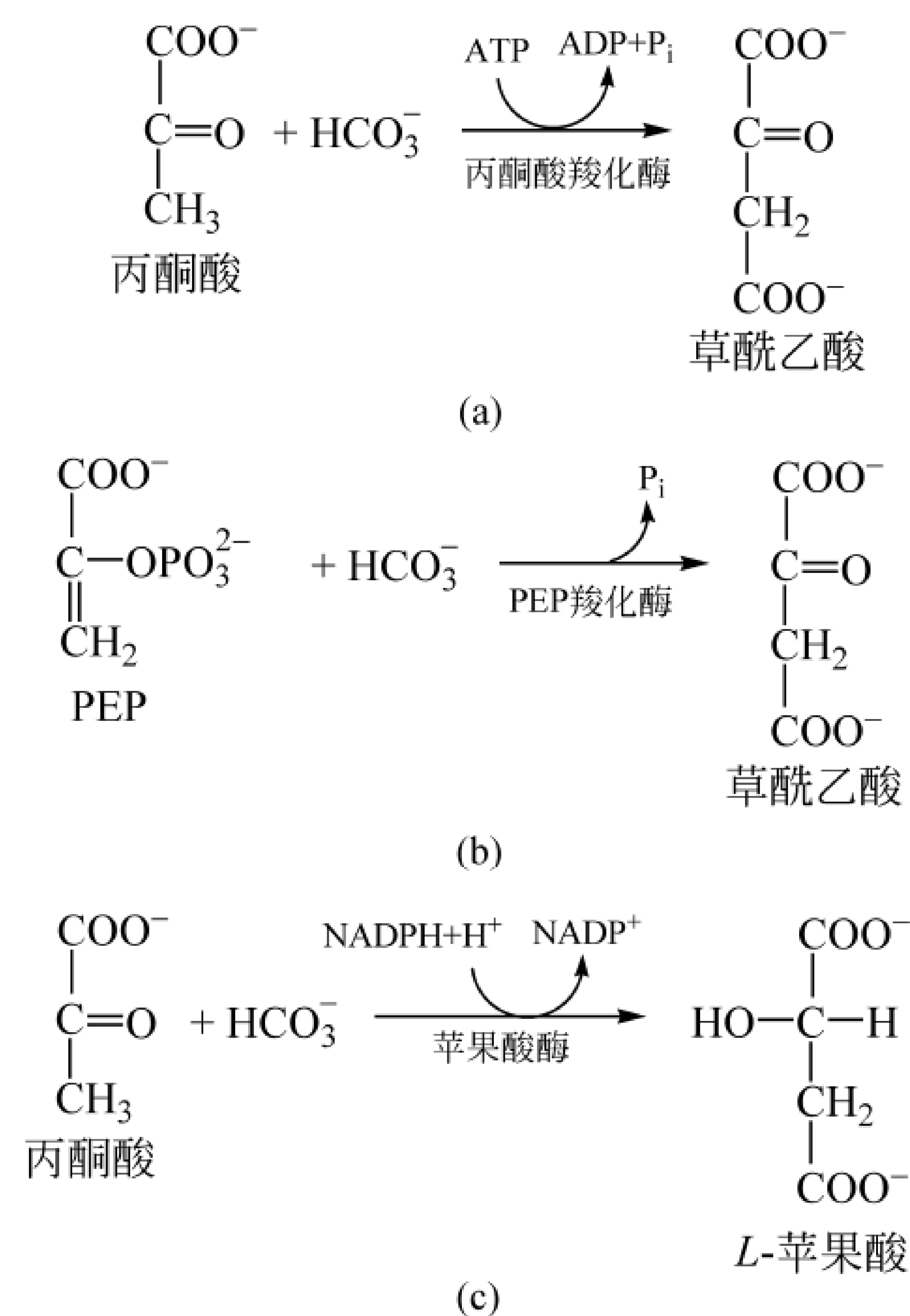


图 14.19　添补反应

(a) 丙酮酸羧化酶反应；(b) PEP 羧化酶反应；(c) 苹果酸酶反应

14.5 乙醛酸循环

在下一章糖原代谢和糖异生中将讲到,由非糖前体生成糖时需要丙酮酸或者草酰乙酸作为合成的前体。在动物体内,虽然乙酰CoA中的2个碳原子经柠檬酸循环可以整合到草酰乙酸的分子中,但实际上每整合2个碳原子,而其他2个碳原子又以2个CO_2分子通过柠檬酸循环释放出去,所以乙酰CoA不能作为净合成葡萄糖的碳源。可是在植物、微生物和酵母中却存在着一个可以由二碳化合物生成糖的生物合成途径——乙醛酸循环(glyoxylate cycle)(图14.20)。

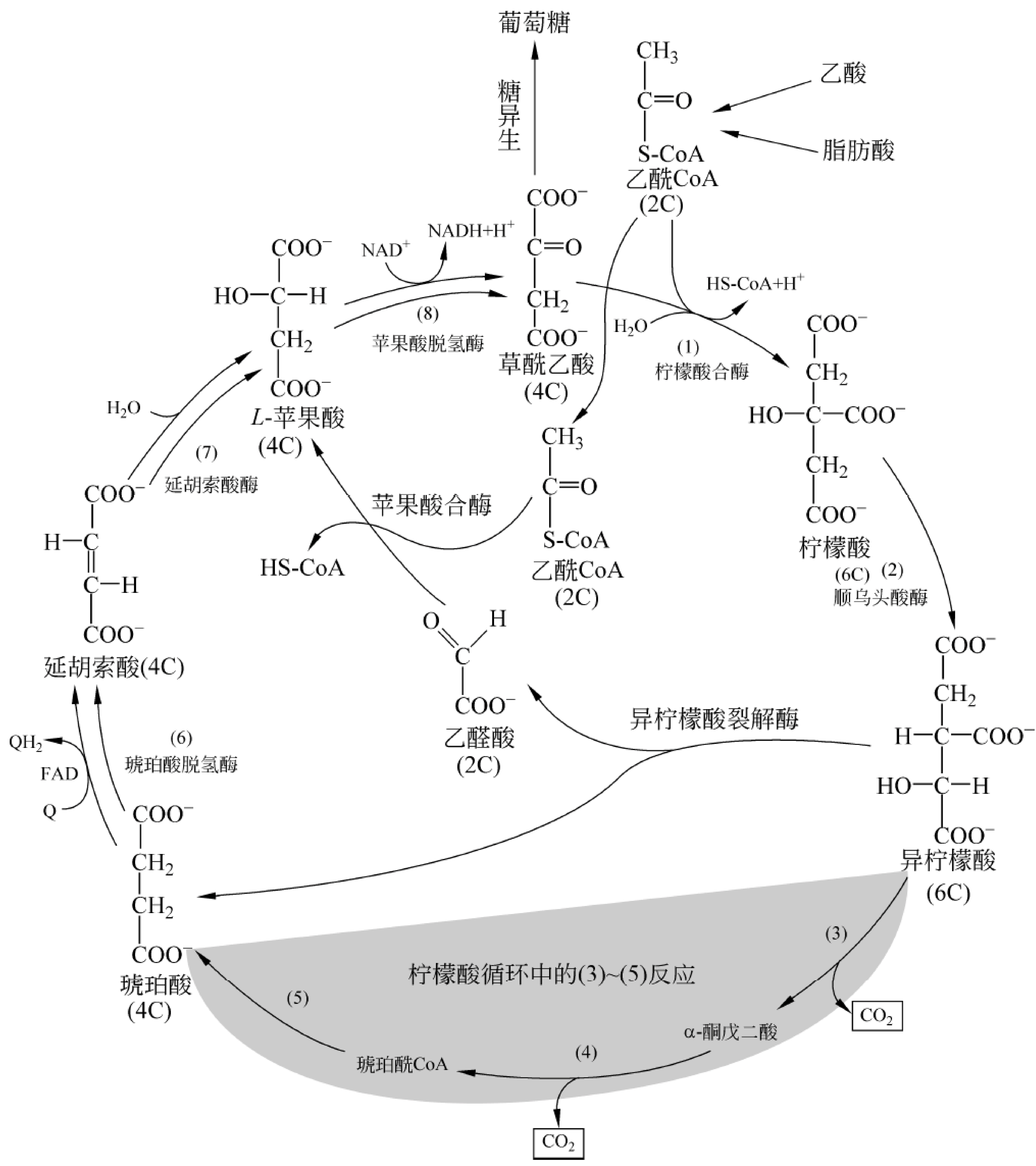


图14.20 乙醛酸循环

在乙醛酸循环(阴影以外的部分)中,两个乙酰CoA进入循环,一个进入柠檬酸合酶反应,另一个进入苹果酸合酶反应

乙醛酸循环常被看作是柠檬酸循环的一条支路，循环中有两个特有的反应，一个是异柠檬酸裂解酶(isocitrate lyase)催化的异柠檬酸裂解生成乙醛酸和琥珀酸反应，另一个是苹果酸合酶(malate synthase)催化的乙醛酸与另一分子乙酰 CoA 缩合生成苹果酸的反应(图 14.21)。

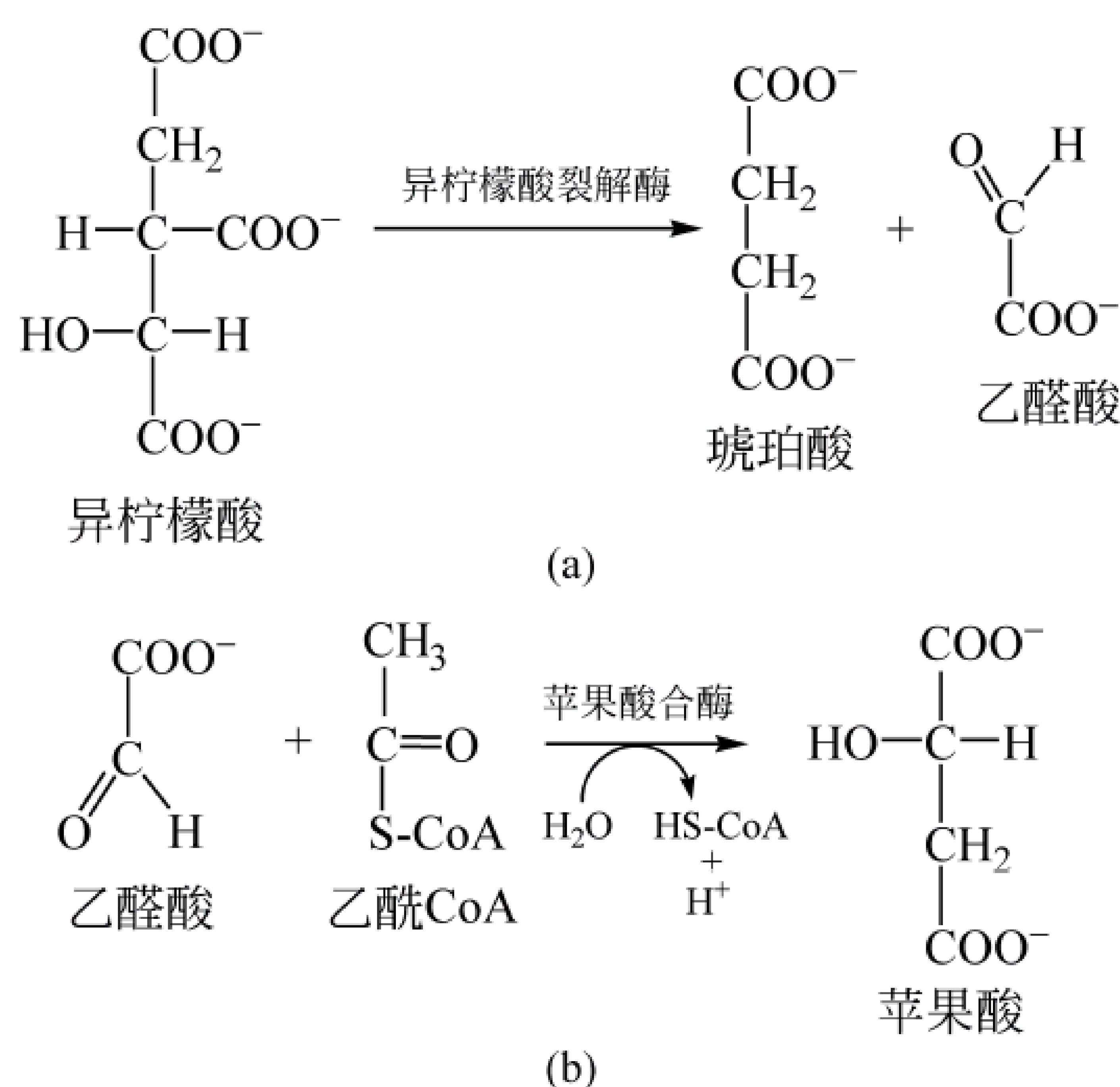
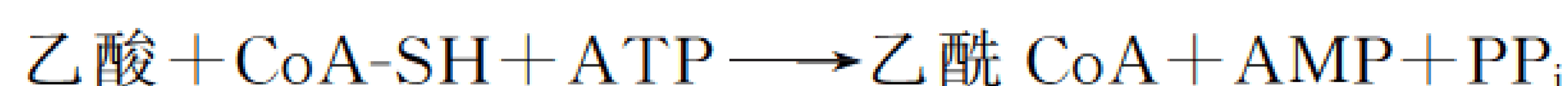


图 14.21　乙醛酸循环反应

(a) 异柠檬酸裂解酶反应；(b) 苹果酸合酶反应

乙醛酸循环通过两个反应组成的一个旁路绕过了柠檬酸循环产生 2 分子 CO_2 的 3 步反应，结果在乙醛酸循环中乙酰 CoA 中的乙酰基的 2 个碳原子没有以 CO_2 形式释放掉。两分子乙酰 CoA 净形成了一分子四碳草酰乙酸，草酰乙酸作为前体可通过糖异生途径合成葡萄糖。乙醛酸循环生成的琥珀酸经柠檬酸循环被氧化为苹果酸和草酰乙酸可以维持柠檬酸循环所需的代谢中间物。

乙醛酸循环途径首先是在细菌中发现的，后来在植物、真菌、藻类和原生动物也发现存在乙醛酸循环。例如，*E. coli* 及许多真菌和原生动物都含有催化乙醛酸和柠檬酸循环的全套酶，这些生物可以在以乙酸为惟一碳源的环境中生长。这些细胞在乙酸激酶催化下可以由乙酸合成乙酰 CoA。乙酰 CoA 既可以经柠檬酸循环用于产生能量，也可以经乙醛酸循环途径用于糖异生前体的合成。



$$\text{乙酸}+\text{CoA-SH}+\text{ATP}\longrightarrow\text{乙酰 CoA}+\text{AMP}+\text{PP}_i$$

在植物中，乙醛酸循环的酶都处于称为乙醛酸循环体(glyoxesome)的细胞器内，在富含脂质的植物种子中，还含有降解种子中储存的脂肪和脂肪酸的酶，因为油料作物种子要利用种子内的脂肪降解生成的乙酰 CoA 合成发芽所需要的葡萄糖。但乙醛酸循环体中，没有琥珀酸脱氢酶和延胡索酸酶，需要借助线粒体中的柠檬酸循环中的酶，所以在发芽的种子中由脂肪降解生成的乙酰 CoA 中的二碳单位净合成葡萄糖的过程涉及 3 个部位：乙醛酸循环体、线粒体和胞质溶胶(图 14.22)。

从图 14.22 看到，两个乙酰基进入乙醛酸循环，一轮循环后生成草酰乙酸维持循环进行。实际上乙醛酸循环净生成的产物是琥珀酸。琥珀酸经胞质溶胶转运至线粒体，借助线粒体中的柠檬酸循环酶生成苹果酸，苹果酸经转运进入胞质溶胶。进入胞质溶胶中的苹果

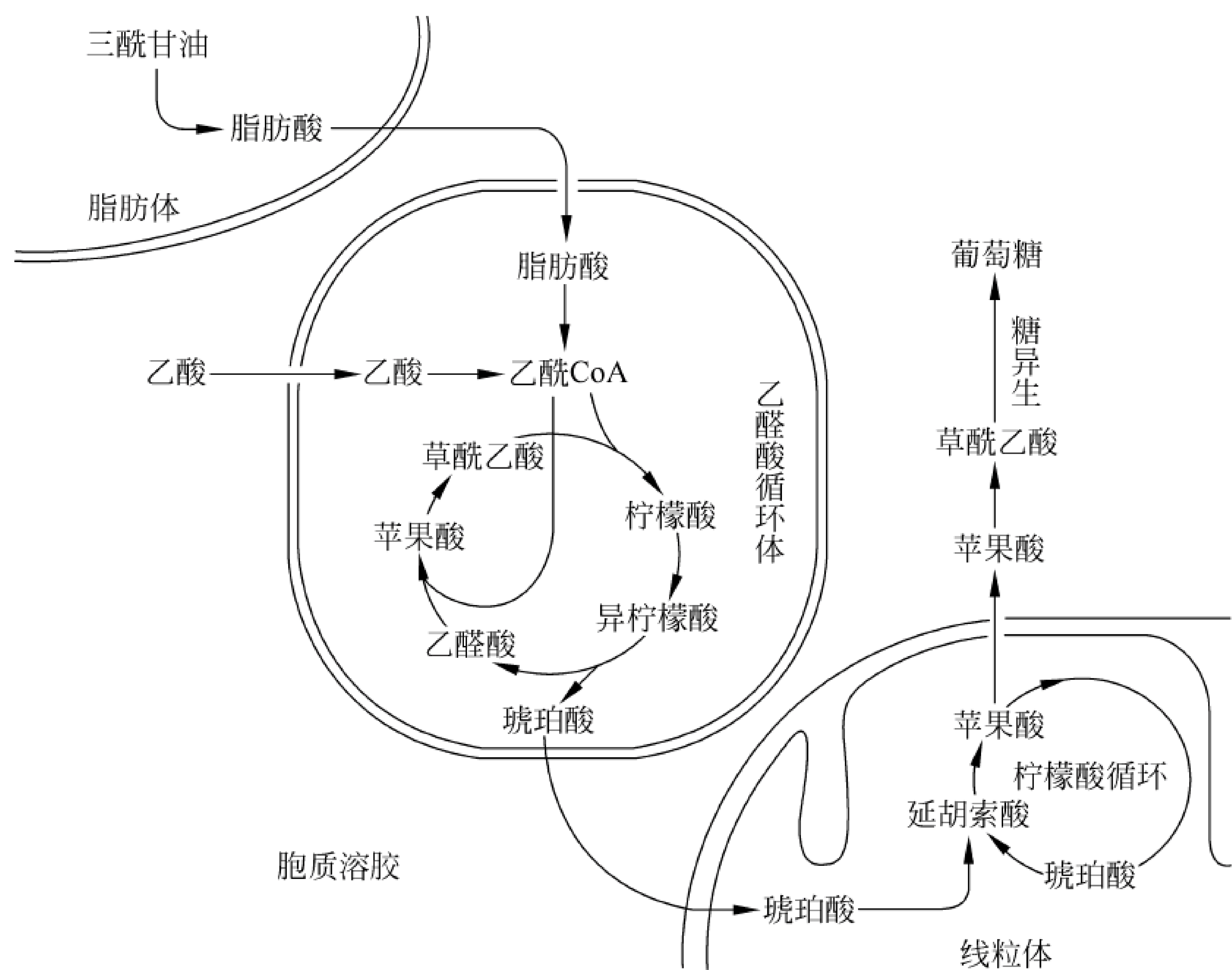


图 14.22　植物中的乙醛酸循环

酸经苹果酸脱氢酶同工酶催化生成草酰乙酸,草酰乙酸经糖异生途径可生成葡萄糖。

乙醛酸循环的总反应式可写成:

$$2\text{乙酰 CoA} + 2NAD^+ + 2H_2O \longrightarrow \text{琥珀酸} + 2CoASH + 2NADH + 2H^+$$



相关话题　柠檬酸循环与减肥

作为人最大的烦恼之一是增重容易减肥难。为什么减肥这么难?要回答这个问题,就需要非常仔细地研究柠檬酸循环反应,特别是其中的脱羧反应。

每个人都知道所有过量摄取的食物,例如糖和蛋白质都会转换成脂肪库,更不用说脂肪了。这些分子可相互转换,但脂肪不能净生成糖。因为脂肪分子要制造葡萄糖,首先要以乙酰 CoA 进入柠檬酸循环,然后以草酰乙酸形式用于糖异生。不幸的是,进入循环的两个碳在随后的脱羧反应中又以两个 CO_2 形式除去了。虽然这两个碳不是刚进入循环的那两个碳,但总的效果是没有净生成草酰乙酸,也就是说脂肪不能转化为糖。

人对血糖水平非常敏感,特别是脑细胞优选葡萄糖作为燃料。如果摄入的糖远超过需要,过量糖就会转为脂肪。人很容易发胖(长脂肪),特别是上了年纪的人。当吃得少时,储存的脂肪降解形成的乙酰 CoA 为柠檬酸循环提供了一个稳定能源。我们可以通过减少热量摄入减去一些体重。不幸的是,当我们的糖原用完后不久,我们的血糖也降低了,因为我们没有非常多的维持血糖水平的储备糖原。

血糖下降之后,我们变得抑郁、懒惰和暴躁。如果继续节食,血糖从哪来呢?只剩下一个来源蛋白质,蛋白质被降解为氨基酸,最终转换为丙酮酸或柠檬酸循环中间物,可用于糖

异生。这样做的结果使我们既失去了脂肪，又失去了肌肉。

利用学到的生物化学知识，我们可找到一个比节食更好的减肥方式：锻炼。如果锻炼方式正确，你可以训练机体去利用脂肪为柠檬酸循环提供乙酰 CoA。如果你维持正常饮食，你将维持你的血糖和糖的储备，而且为了减肥不用降解蛋白质。随着锻炼对食物摄取的适当平衡，在不牺牲糖储备或蛋白质的条件下，我们可以增加脂肪的降解。实质上，训练减肥与饮食减肥相比，那是更容易和更健康的减肥方式。

小结

1. 丙酮酸脱氢酶复合物催化丙酮酸氧化形成乙酰 CoA 和 CO_2。

2. 每一分子乙酰 CoA 经柠檬酸循环氧化生成两分子 CO_2，三分子 NAD^+ 被还原为 NADH，1 分子 Q 被还原为 QH_2，以及由 GDP 和 P_i 生成 1 分子 GTP（或因生物种类不同由 ADP 和 P_i 生成 ATP）。

3. 柠檬酸循环的八步酶催化的反应起着多步催化剂的作用。

4. 在真核细胞中作为丙酮酸脱氢酶复合物底物的丙酮酸需要通过特殊的转运蛋白由胞质溶胶转运到线粒体内。

5. 每一分子乙酰 CoA 进入柠檬酸循环产生的还原型辅酶氧化可产生约 10 分子 ATP，如果考虑糖酵解途径生成的还原型辅酶和 ATP，1 分子葡萄糖完全氧化约生成 30（或 32）分子 ATP。

6. 丙酮酸经由乙酰 CoA 被彻底氧化过程中在丙酮酸脱氢酶复合物、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应步骤中受到调控。

7. 除了在氧化分解代谢中的作用之外，柠檬酸循环还提供生物合成的前体。添补反应补充循环的中间物。

8. 乙醛酸循环涉及柠檬酸循环中几种酶和另外的异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶。植物和某些微生物通过该循环可利用乙酰 CoA 生成四碳中间物（最终生成糖）。

习题

1. 以下 ^{14}C 标记的哪个葡萄糖分子在糖酵解和丙酮酸脱氢酶反应会产生 $^{14}CO_2$？

(a) 1-[^{14}C]-葡萄糖；(b) 3-[^{14}C]-葡萄糖；(c) 4-[^{14}C]-葡萄糖；(d) 6-[^{14}C]-葡萄糖。

2. 处于休克的病人降低了氧气向组织的输送，降低了丙酮酸脱氢酶复合物活性，而增加了无氧代谢。过多的丙酮酸被转化成乳酸，并积累在血液和组织中，导致乳酸酸中毒。

(a) 既然氧气不是柠檬酸循环的反应物和产物，为什么低水平的氧会降低丙酮酸脱氢酶复合物的活性呢？

(b) 为减轻乳酸酸中毒症，有时对休克病人使用可以抑制丙酮酸脱氢酶激酶的二氯乙酸，为什么这样治疗会影响丙酮酸脱氢酶复合物的活性？

3. 如果将乙酰 CoA 乙酰基上的 2 个 C 原子用 ^{14}C 标记后进行柠檬酸循环研究。请问

经过第一轮、第二轮和第三轮柠檬酸循环后,释放出来$^{14}CO_2$放射性强度比率如何?(假设在第二轮和第三轮循环中再加入的乙酰CoA不带任何放射性)

4. 饮食中缺乏维生素B_1(硫胺素)引起脚气病,该病除了出现神经和心脏病方面的症状以外,还会导致血液中丙酮酸和α-酮戊二酸水平的升高,请解释。

5. 氟乙酸是一个可以阻断柠檬酸循环的毒性很强的分子,常被用作灭鼠药。氟乙酸在体内可经酶转化成氟乙酰CoA,然后在柠檬酸合酶的作用下生成氟柠檬酸,它是顺乌头酸酶的强有力的竞争性抑制剂。你认为氟乙酸对柠檬酸循环中间体的浓度有什么影响,怎样才能消除它对循环的抑制作用?

6. (1) 在琥珀酸脱氢酶反应中,以$1/v$对$1/[S]$作图(v表示速度,[S]表示底物浓度),画出(a)没有抑制物,(b)存在丙二酸的反应曲线。

(2) 是否可以通过加入草酰乙酸的方法来降低丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制效应?

7. 如果某些组织(例如血淋巴细胞)的线粒体和胞液中都缺乏柠檬酸循环中的一种酶,会导致新生儿严重的神经异常,这种病特征是尿液中非正常排泄大量的α-酮戊二酸、琥珀酸和延胡索酸。什么酶缺乏会出现这样的症状?

8. 计算在下列柠檬酸循环的净反应中生成的ATP分子数量。假设所有的NADH和$FADH_2$都被氧化生产ATP,丙酮酸都被转化成乙酰CoA。

(a) 柠檬酸$\longrightarrow$草酰乙酸$+2CO_2$;(b) 1丙酮酸$\longrightarrow 3CO_2$。

9. 许多氨基酸可降解为丙酮酸或柠檬酸循环中间物。丙酮酸生成的乙酰CoA进入柠檬酸循环可被彻底氧化为CO_2,为什么柠檬酸中间物身处柠檬酸循环中却不能被彻底氧化呢?

10. 以下各种情况对柠檬酸循环有什么影响。

(a) 增加NAD^+浓度;(b) 降低ATP浓度;(c) 增加异柠檬酸浓度。

11. (a)柠檬酸循环可以将一分子柠檬酸转化为一分子草酰乙酸,使循环继续进行。如果其他循环中间物被作为氨基酸合成的前体耗尽的话,草酰乙酸能通过柠檬酸循环中的酶由乙酰CoA净合成吗?(b)当草酰乙酸不足时,还能使柠檬酸循环继续进行吗?

12. (a)当两分子的乙酰CoA通过柠檬酸循环被转化成4分子CO_2时,最终能生成多少分子ATP(假定NADH 2.5ATP,而QH_2约为1.5ATP)?当两分子乙酰CoA通过乙醛酸循环被转化成草酰乙酸时,能生成多少分子ATP?(b)生产ATP是这两条途径的主要功能吗?

15　糖原代谢和糖异生

对于包括人在内的动物，葡萄糖的消耗必然导致血糖降低，此时需要储存的糖原(glycogen)降解生成葡萄糖和通过非糖物质经糖异生途径合成葡萄糖来维持血糖的稳定。当葡萄糖来源丰富时，如饭后葡萄糖丰富时，再合成和储备糖原。

15.1　糖原代谢

葡萄糖是以淀粉或糖原等多糖形式储存在细胞内的，脊椎动物中的大多数糖原储存在肌细胞和肝细胞中。

15.1.1　糖原降解

肌细胞和肝细胞中的糖原降解过程类似，但糖原降解途径在这 2 个部位的作用不同。在肌肉组织中，糖原降解形成葡糖-6-磷酸，然后通过糖酵解和柠檬酸循环代谢。在肝中，大多数葡糖-6-磷酸都转换为葡萄糖，然后通过血液输送给其他细胞，例如脑细胞、红细胞和脂肪细胞等。

糖原降解从非还原端开始，假设糖原含有 n 个葡萄糖残基，糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase)催化糖原磷酸解(phosphorolysis)，生成了含 $n-1$ 个葡萄糖残基的糖原和 1 分子葡糖-1-磷酸(图 15.1)。磷酸解是通过将基团转移到磷酸的氧原子使键断开，形成磷酸

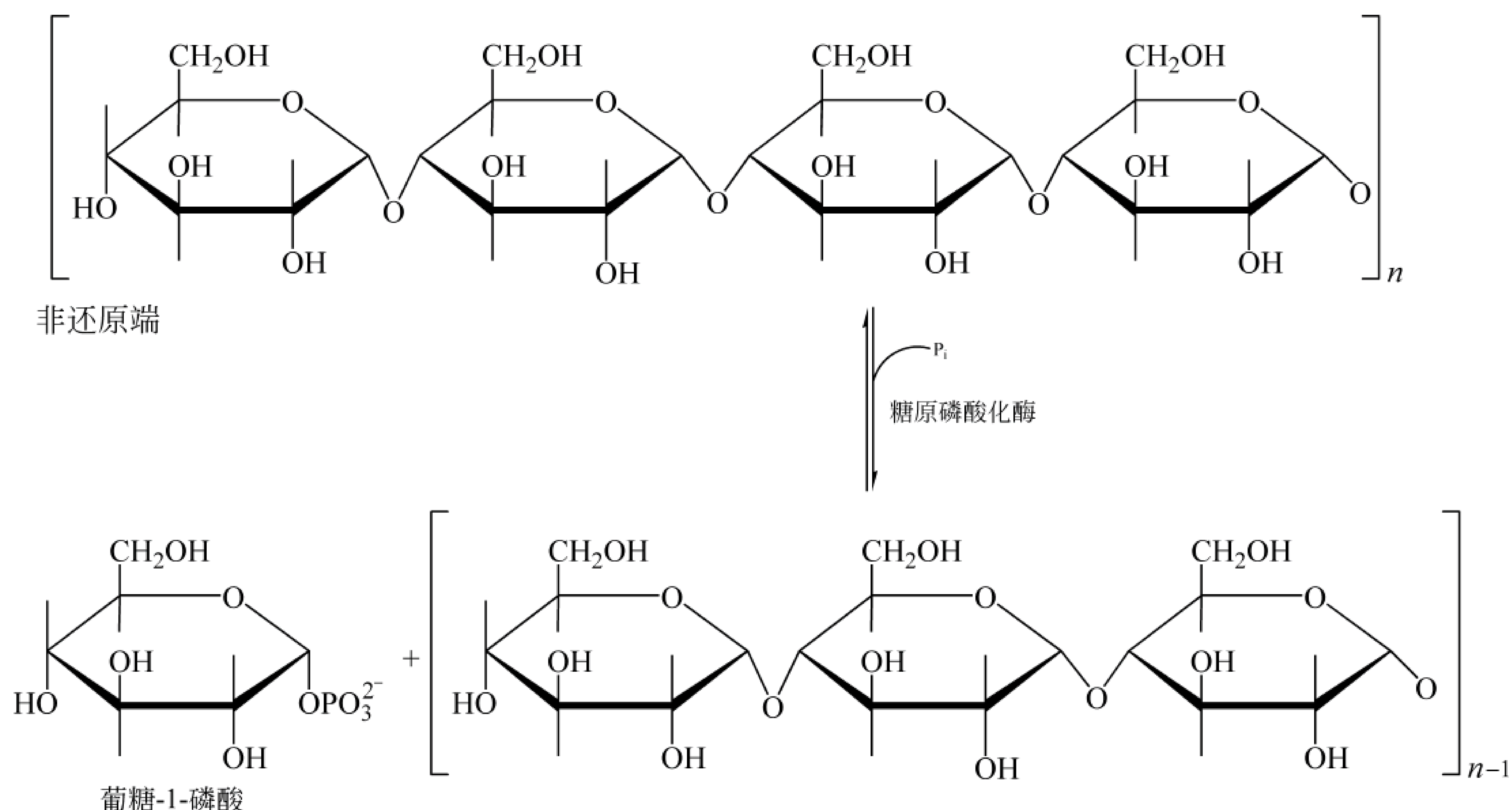


图 15.1　糖原磷酸化酶反应

酯的一种化学反应(水解是将基团转移到水分子上)。植物中淀粉的降解与糖原降解反应类似,但催化淀粉磷酸解的酶称为淀粉磷酸化酶。



糖原(n 个残基) $+HPO_4^{2-} \longleftrightarrow$ 葡糖-1-磷酸+糖原($n-1$ 个残基)

糖原磷酸化酶是由 2 个相同亚基组成的二聚体酶,每个亚基相对分子质量是 97 000。糖原磷酸化酶是个转换酶(interconvertible enzyme),具有高活性、共价修饰的磷酸化形式称为糖原磷酸化酶 a;而具有低活性、去磷酸的形式称为糖原磷酸化酶 b,两者在相应激酶和磷酸酶催化下可相互转换。

生成的葡糖-1-磷酸在磷酸葡糖变位酶(phosphoglucomutase)的作用下可被转换为葡糖-6-磷酸,反应是可逆的(图 15.2)。

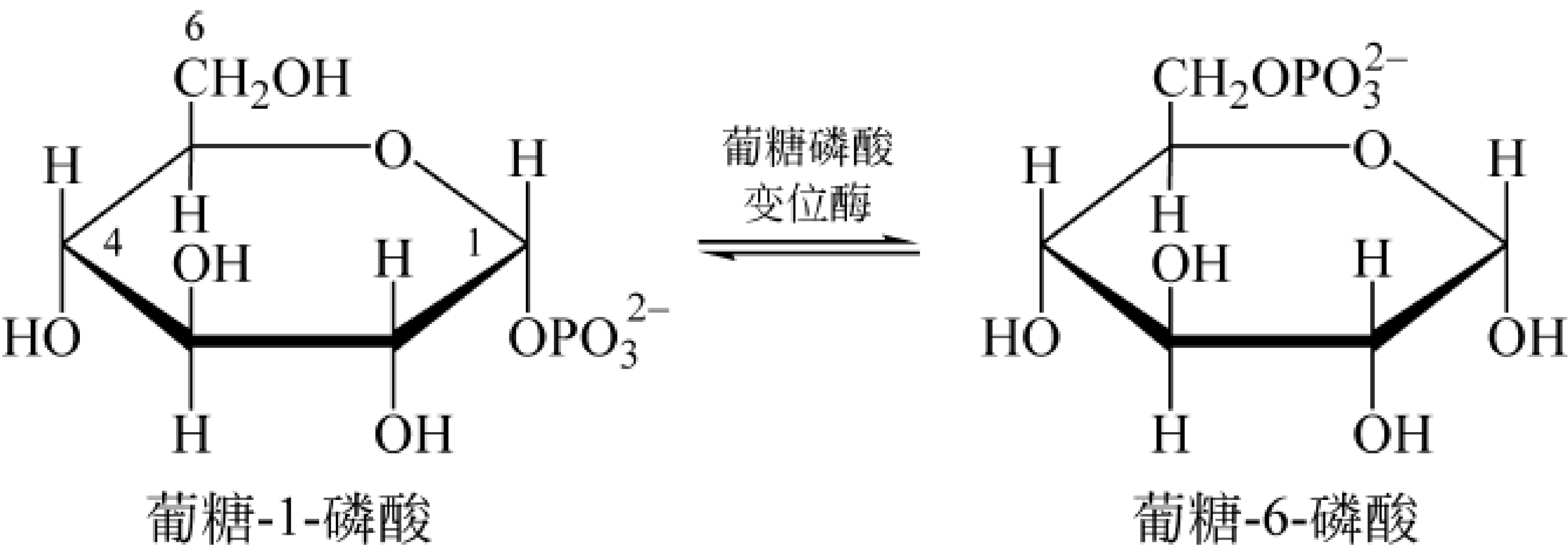


图 15.2 葡糖磷酸变位酶反应

糖原磷酸化酶可以从糖原的非还原端连续地进行磷酸解,降解直至距 α-1,6 糖苷键的分支点还剩下 4 个葡萄糖单位的部位停止,剩下的底物称为极限糊精(limit dextrin),然后通过糖原去分支酶(glycogen debranching enzyme)进一步降解。去分支酶具有葡聚糖转移酶(glucantransferase)和淀粉-1,6-葡糖苷酶(amylo-1,6-glucosidase)两种催化活性。葡聚糖转移酶催化支链上的 3 个葡萄糖残基转移到糖原分子的 1 个游离末端上,形成一个新的 α-1,4 糖苷键。而淀粉-1,6-葡糖苷酶催化剩下的 α-1,6 糖苷键连接的葡萄糖残基水解,释放出 1 分子葡萄糖。因此,糖原完全降解时,糖原聚合物中每个分支点都可释放出 1 分子葡萄糖(图 15.3)。在肝内葡糖-6-磷酸酶催化葡糖-6-磷酸去磷酸生成糖原降解的最终产物葡萄糖。

在糖酵解中了解到,如果以葡萄糖作为底物,可以净生成 2 分子 ATP,而糖原完全降解生成的约 90%葡萄糖残基是糖原通过糖原磷酸化酶磷酸解生成的,并经磷酸葡糖变位酶转换为葡糖-6-磷酸,所以这些葡萄糖残基经糖酵解降解至丙酮酸时可以获得 3 分子 ATP。很显然糖原中绝大部分葡萄糖残基生成的能量高,这是因为在葡萄糖磷酸化中少消耗了 1 分子 ATP。

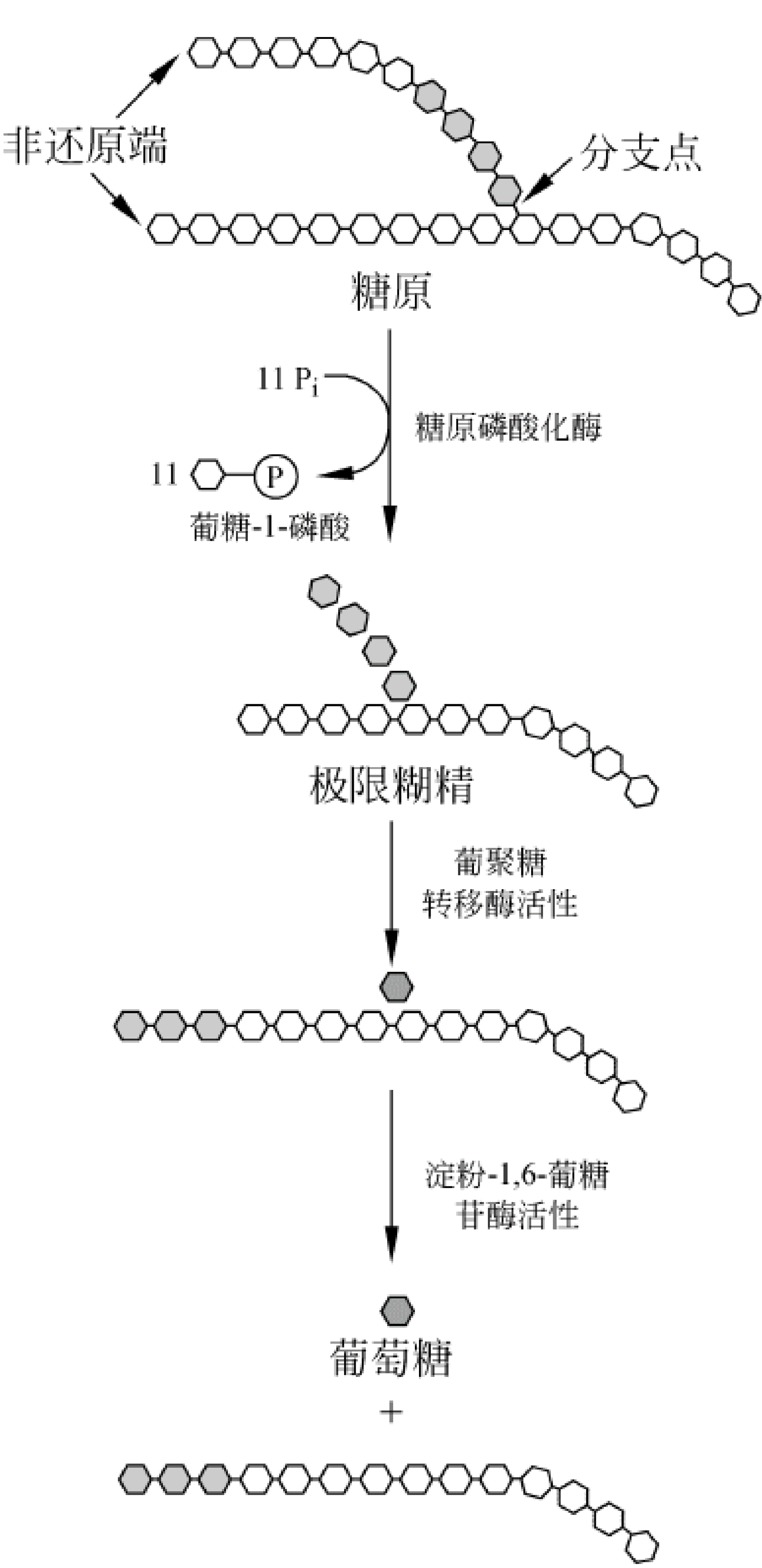


图 15.3 糖原降解

15.1.2　糖原合成

饮食中的葡萄糖被吸收后，一部分被转化为储存多糖糖原。根据体外的研究结果，在20世纪50年代以前，人们一直认为糖原磷酸化酶既降解糖原，又催化糖原的合成。随着体内反应物和产物测定越来越可靠，人们发现糖原降解的反应是不可逆的，即糖原的生物合成走的是另外一条途径。糖原合成需要能量，能量是由尿嘧啶核苷三磷酸(UTP)提供的，而且糖原合成的底物不是葡萄糖，而是UDP-葡糖。

葡萄糖通过血液运输进入肝细胞，在己糖激酶催化下磷酸化生成葡糖-6-磷酸。而将一个葡糖-6-磷酸中的葡糖基通过α-(1→4)糖苷键结合到原有糖原分子上(糖原的延伸)还需要进行3步酶促反应(图15.4)。

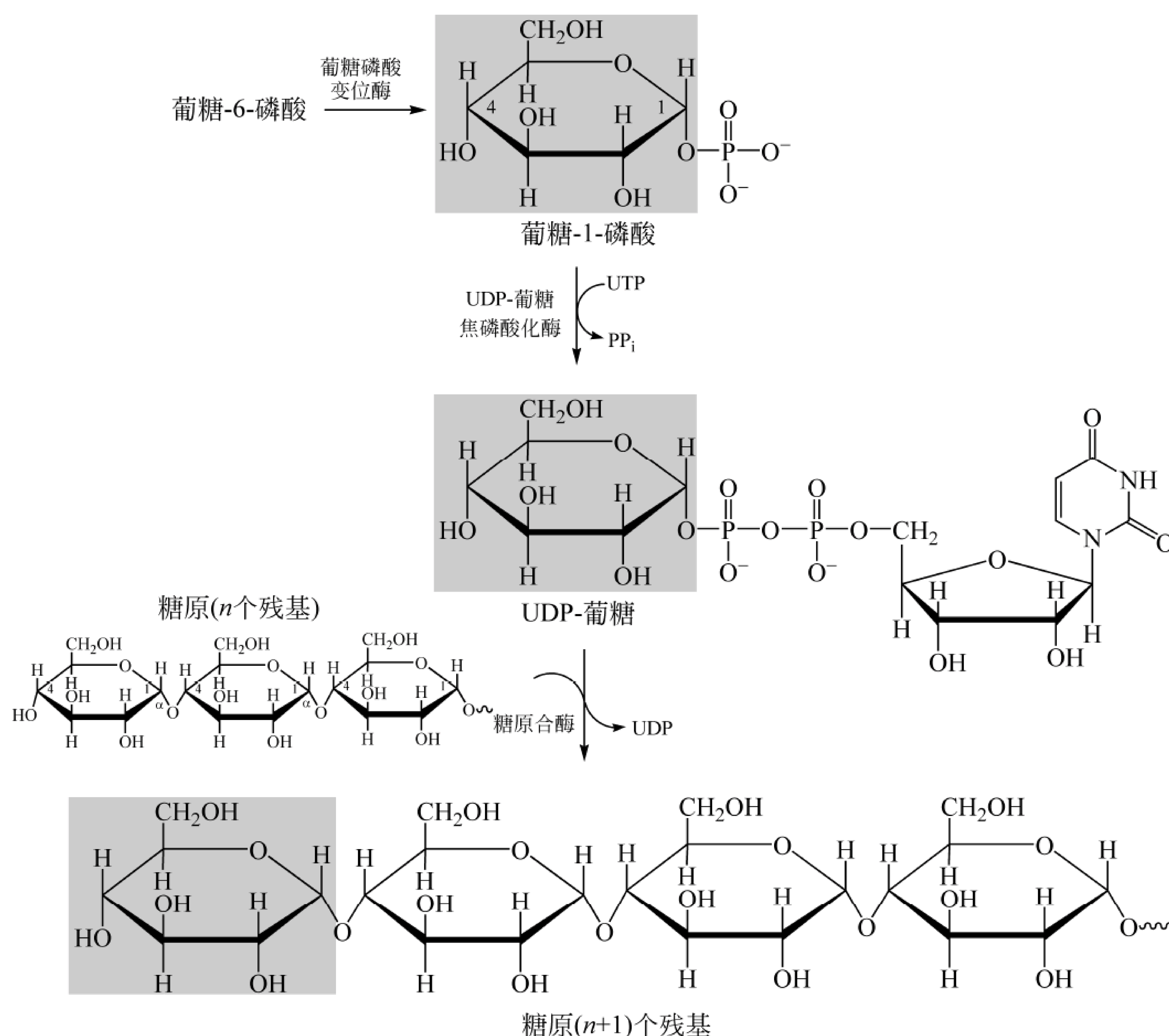


图15.4　糖原的生物合成

首先磷酸葡糖变位酶将葡糖-6-磷酸转换为葡糖-1-磷酸，然后在UDP-葡糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)作用下葡糖-1-磷酸被UTP活化，生成UDP-葡糖和无机焦磷酸(PP_i)。最后，在糖原合酶(glycogen synthase)催化下，UDP-葡糖中的葡糖基通过α-(1→4)糖苷键结合在作为引物的糖原(n个残基)的非还原端。所以，糖原的合成方式又称为尾部合成方式，而且需要一个至少含有4个葡糖基的引物。植物和某些细菌合成淀粉或

糖原时,使用的底物是ADP-葡糖,而不是UDP-葡糖。

糖原合酶只能延伸一个原有的α-(1→4)连接的葡聚糖链,但不能催化两个葡糖残基的缩合。如果要从头合成糖原,需要一个糖原蛋白(glycogenin)(也有翻译为糖原素或糖原引发蛋白)。从头合成的第一步是将一个由UDP-葡糖提供的一个葡糖残基共价连接在糖原蛋白自身的一个酪氨酸残基上,然后在已有的这个葡糖残基上糖原蛋白自动催化延伸葡聚糖链,直至合成至少有7个葡糖残基的可作为糖原引物的葡聚糖链。之后再由糖原合酶延伸该引物合成糖原。

合成糖原还需要分支酶(branching enzyme)催化糖原支链的形成。分支酶从延伸的葡糖链的非还原端除去至少含有6个葡糖残基的寡糖链,转移到新的分支点葡糖基的位置,并催化形成α-(1→6)糖苷键(图15.5)。新的分支点至少离开最近分支点4个葡糖残基以上。

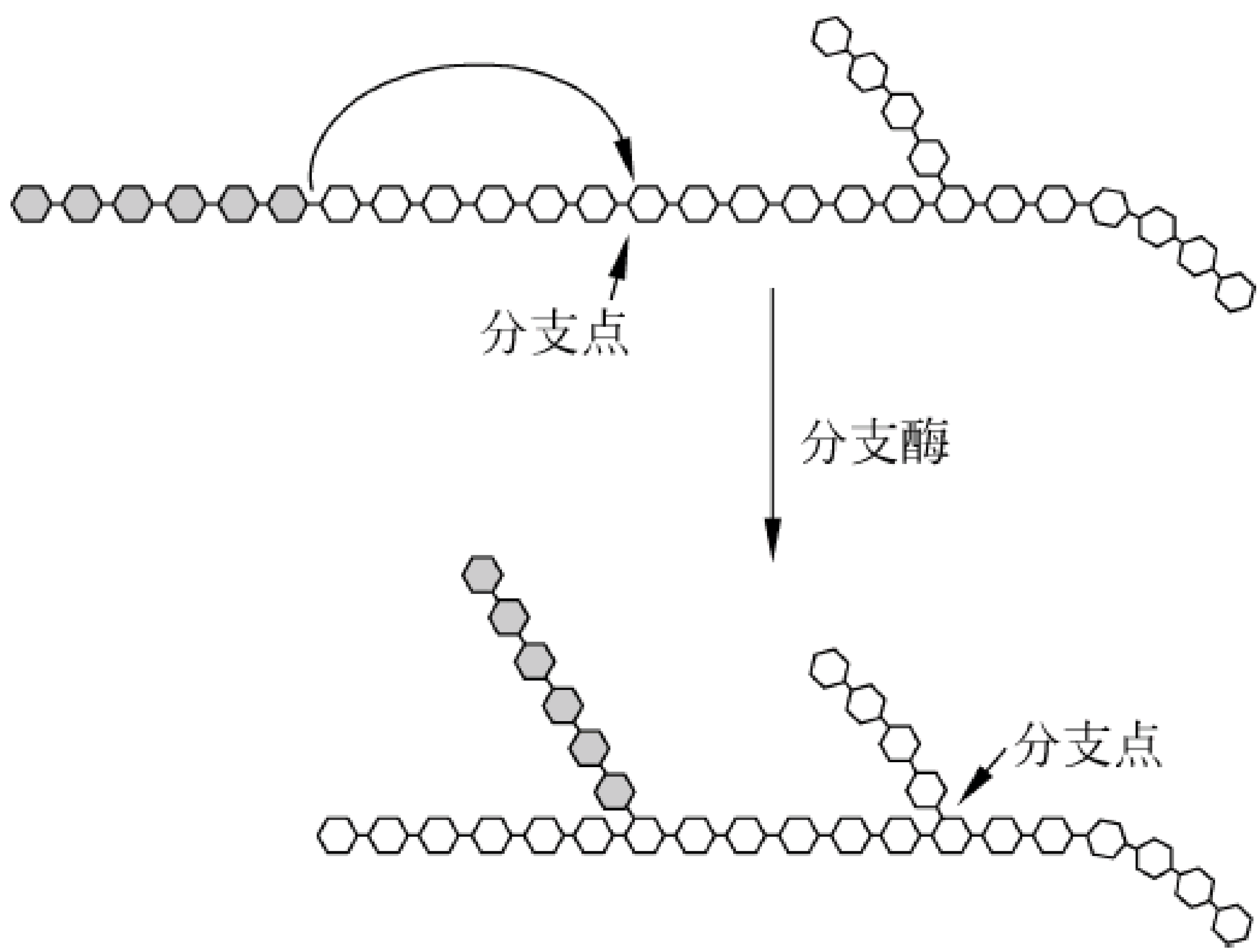


图15.5　分支酶在糖原合成中的作用

相关话题　头部生长和尾部生长方式

聚合反应通常不是以头部生长(合成)方式,就是以尾部生长(合成)方式进行。在头部生长方式中,链的生长端被"激活",该分子的头部处的"高能"键断裂为连接下一个单体提供能量。在尾部生长方式中,在链的生长端不含高能键,但激活的单体提供了聚合能量。

糖原合成就是一个尾部生长方式例子。整合的单体UDP-葡糖是个激活的单体,当反应完成时,糖原链的尾部只是葡萄糖残基C-4处的一个简单羟基。DNA和RNA合成也是尾部生长方式。然而脂肪酸合成(第18章)和蛋白质合成(第11章)却是头部生长方式(图15.6)。



图15.6　聚合反应方式

(a) 头部生长方式,整合的激活单体被加到生长着聚合物的"头"部,反应后聚合物在生长末端仍然含有激活的残基;(b) 尾部生长方式,整合的激活单体被加到生长着聚合物的"尾"部

15.1.3　糖原代谢的调控

糖原代谢都是按照细胞需求来调控的，调控主要涉及糖原磷酸化酶和糖原合酶，调控包括别构调控、共价调控以及激素调控。

1. 糖原磷酸化酶的调控

研究表明糖原磷酸化酶主要受到别构和共价修饰两方面的调控(图 15.7)。

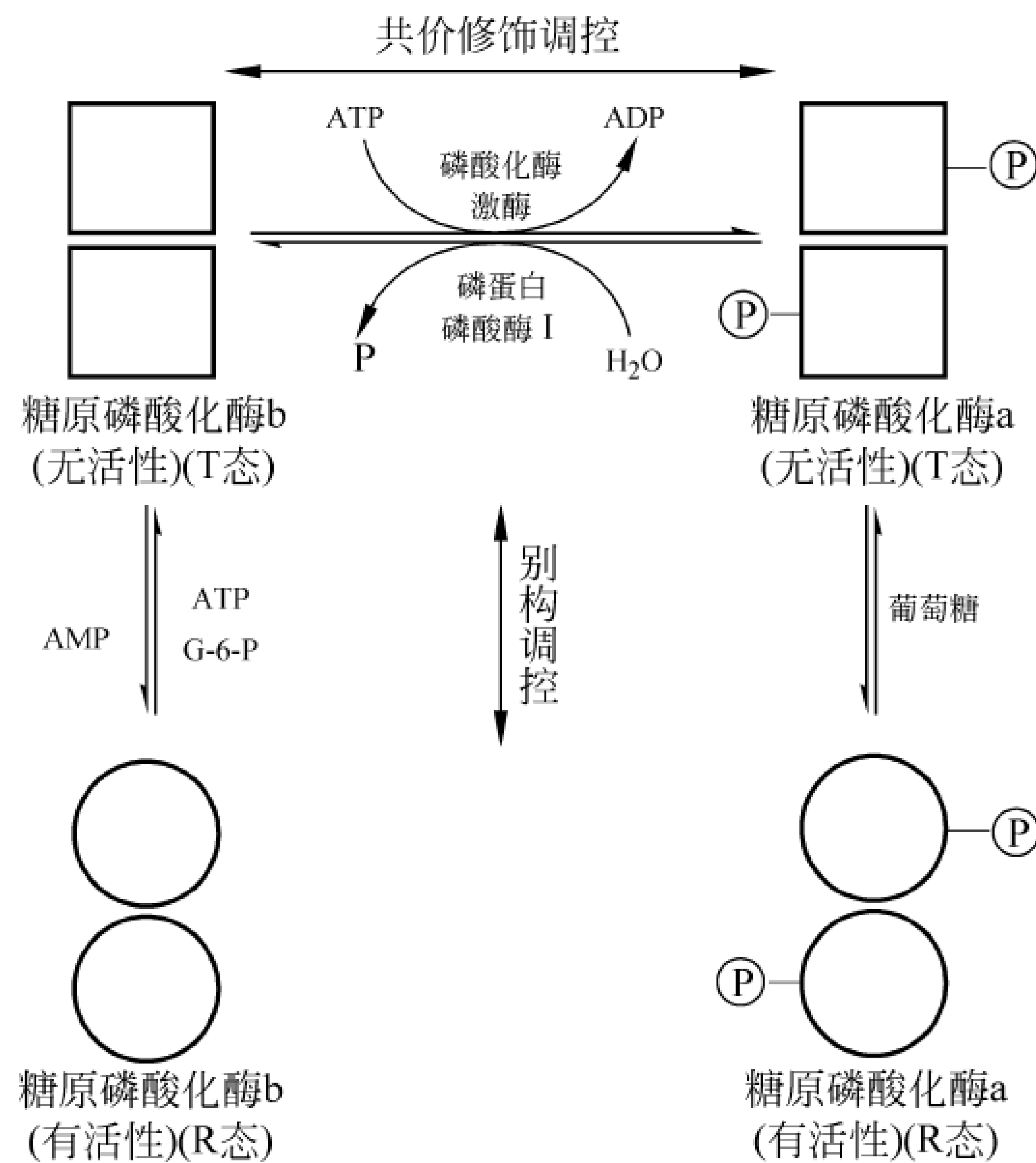


图 15.7　糖原磷酸化酶别构和共价修饰调控机制

(1) 别构调控

在肌肉中经磷酸化酶作用，糖原降解生成的葡糖-1-磷酸很容易转换为葡糖-6-磷酸，经代谢产生 ATP。因此，通过别构抑制剂 ATP 和葡糖-6-磷酸反馈抑制糖原磷酸化酶，降低酶对底物的亲和性是最有效的一种调控糖原降解的方式。所以，从图 15.7 看出 ATP 和葡糖-6-磷酸作为别构抑制剂通过别构作用可以将具有活性的 R 态糖原磷酸化酶 b 转换为无活性的 T 态。

AMP 是糖原磷酸化酶的别构激活剂，AMP 结合别构部位激活糖原磷酸化酶，可以将处于无活性的 T 态糖原磷酸化酶 b 转换为有活性的 R 态。

(2) 共价修饰调控

研究表明别构调控作为一种调节机制通过调节糖原磷酸化酶活性可以满足正常的代谢需求。然而，在紧急需要大量能量(ATP)的危急时刻，主要的调控方式是糖原磷酸化酶的共价修饰，而不是这些别构调控。共价修饰在磷酸化酶激酶催化下，通过糖原磷酸化酶中的 Ser^{14} 的磷酸化，将无活性(或活性很低)的别构调控形式(b 型)转换为有活性的，对别构调控迟钝的形式(a 型)。当糖原磷酸化酶被磷酸化后，T 和 R 态之间的平衡更有利于形成 R 构象。

2. 糖原代谢的激素调控

在哺乳动物中胰高血糖素、胰岛素和肾上腺素是调控糖原代谢的主要激素。胰高血糖

素是一个响应低血糖浓度由胰岛细胞分泌的含有29个氨基酸残基的肽类激素。胰高血糖素通过促进糖原降解使血糖浓度恢复到稳态水平。胰高血糖素对于靶细胞有着严格的选择,只有肝细胞膜存在胰高血糖素特殊受体。图15.8显示了胰高血糖素对糖原代谢的调控作用。

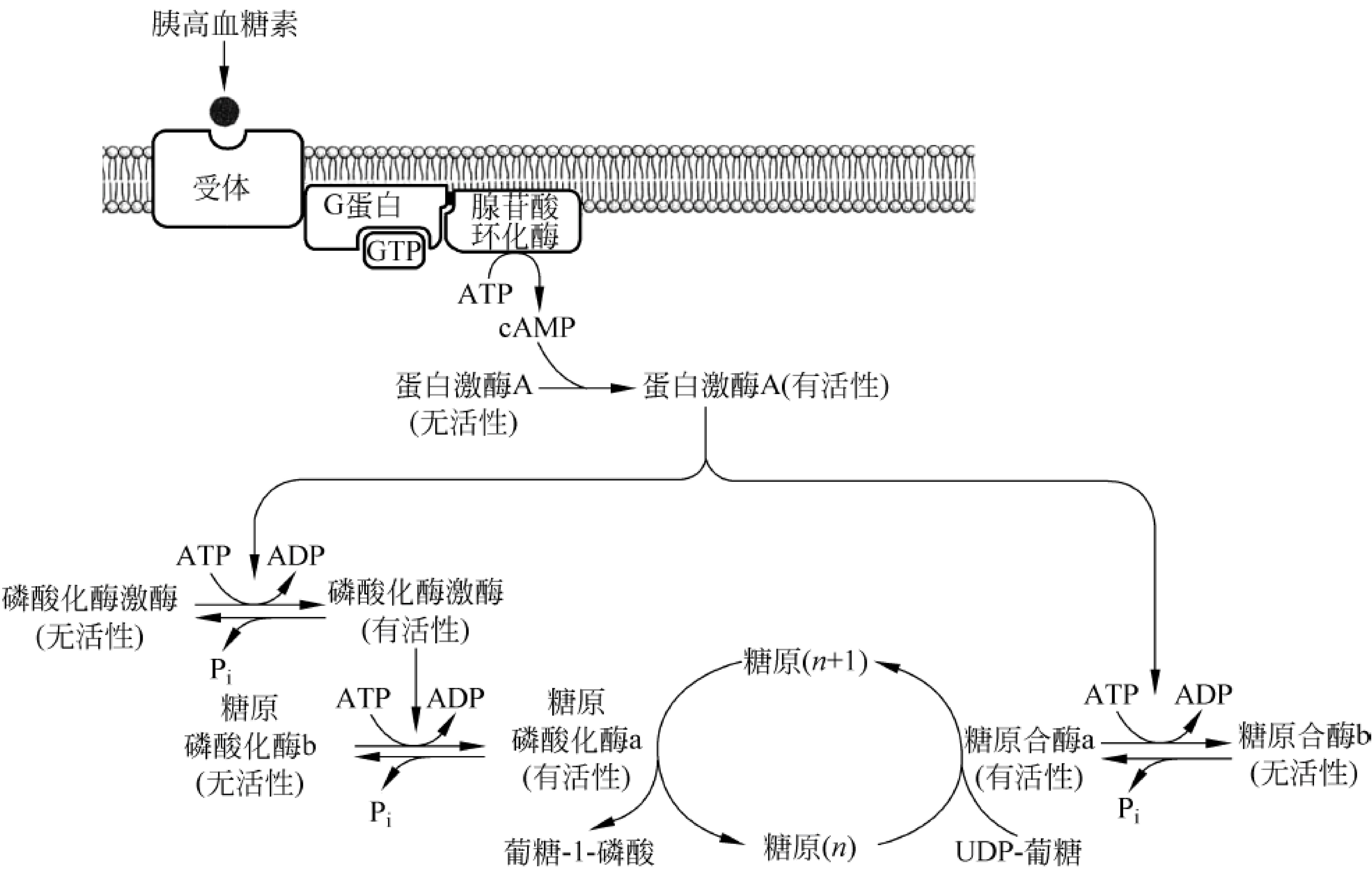


图15.8 胰高血糖素对糖原代谢的作用

首先胰高血糖素与肝细胞表面的受体结合,刺激腺苷酸环化酶使得cAMP浓度增加。cAMP导致蛋白激酶A激活,激活的酶通过使糖原合酶磷酸化,将活性的“a”型酶转换为无活性的“b”型,阻断了糖原合成。另一方面,蛋白激酶A也使磷酸化酶激酶磷酸化,导致糖原磷酸化酶b磷酸化,转换为活性形式的糖原磷酸化酶a,促进了糖原降解的速率。

糖原合酶和糖原磷酸化酶通过磷(酸化)蛋白磷酸酶-1可以去磷酸化,导致与上述作用相反的结果,糖原磷酸化酶失活,而糖原合酶被激活,结果导致由UDP-葡糖合成糖原,同时抑制糖原降解。

胰岛素刺激磷蛋白磷酸酶-Ⅰ活性,促进葡萄糖合成糖原,同时进一步使糖原磷酸化酶失活。肾上腺素的作用类似于胰高血糖素,除了作用于肝细胞外,还可作用于肌细胞,以满足突然的能量需求。

15.2 糖异生

由于外部供给的和细胞内储存的糖的利用是有限的,大多数生物都有一个生物合成葡萄糖的途径。微生物可以将许多营养物质转化为葡萄糖的磷酸酯和糖原。哺乳动物的某些组织,主要是肝、肾可以由非糖前体物质,例如由乳酸和丙酮酸从头合成葡萄糖。由非糖前体物质合成糖的过程称为糖异生(gluconeogenesis)。

15.2.1 糖异生反应

图 15.9 比较了由丙酮酸合成葡萄糖的糖异生与葡萄糖降解至丙酮酸的糖酵解途径，2 个途径中的许多中间代谢物相同，一些反应以及催化反应的酶也一样。糖酵解途径中 7 步可逆反应只要改变反应方向就变成了糖异生中的反应了。但糖异生并非是糖酵解的逆转，其中由丙酮酸激酶、磷酸果糖激酶-1 和己糖激酶催化的 3 个高放能反应就是不可逆转的，需要消耗能量走另外途径，或由其他的酶催化来克服这 3 个不可逆反应带来的能障。

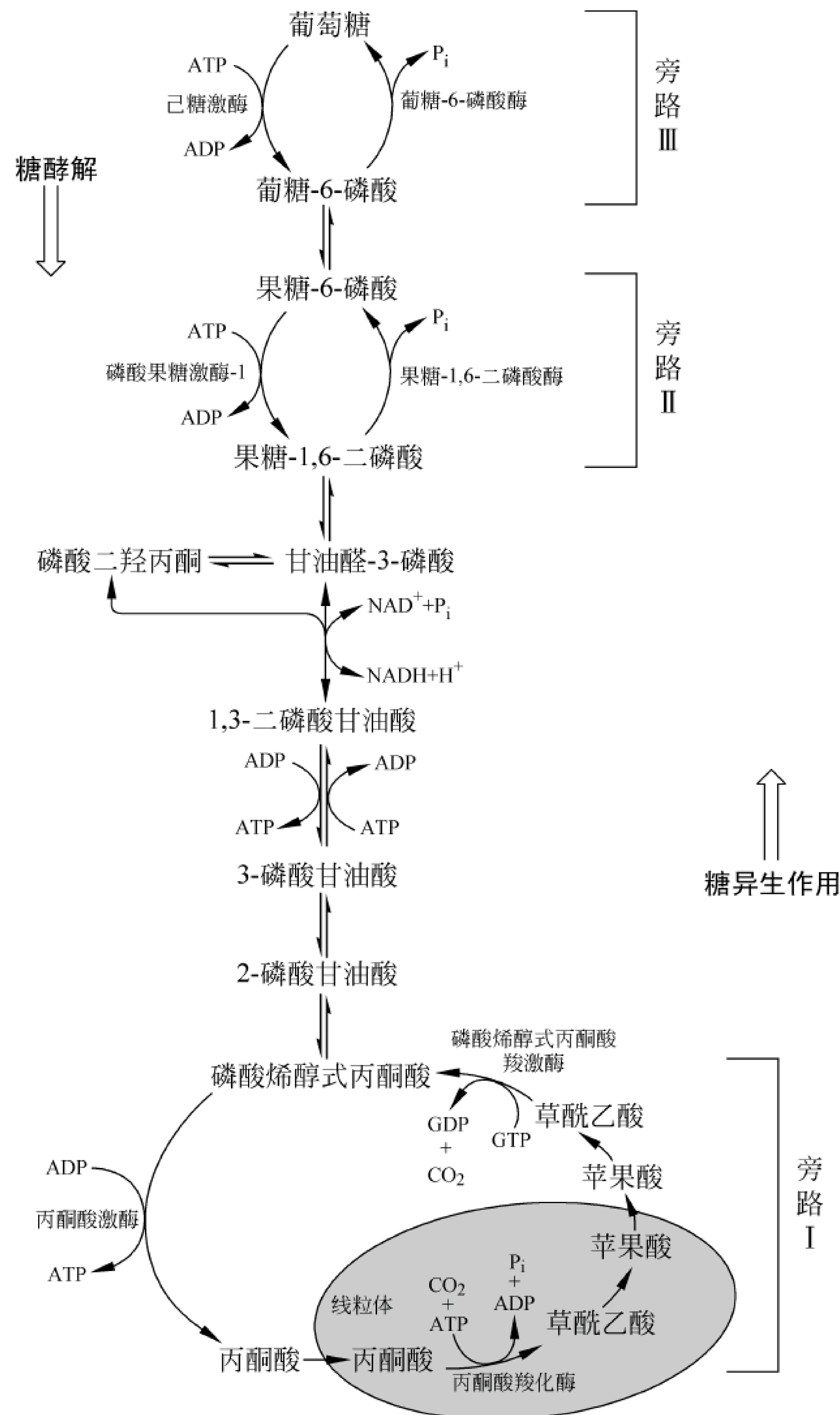


图 15.9 糖异生与糖酵解途径的比较

下面以丙酮酸转化为葡萄糖为例，说明糖异生途径中与糖酵解途径不同的 4 个反应。

1. 旁路Ⅰ：丙酮酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸

(1) 丙酮酸羧化生成草酰乙酸

在丙酮酸羧化酶(生物素作为辅基)的催化下，进入到线粒体的丙酮酸羧化生成草酰乙

酸,消耗1分子ATP,反应为不可逆反应(图15.10)。丙酮酸羧化酶的相对分子质量为520 000,由4个相同的亚基组成,每个亚基的1个赖氨酸残基共价连接1个生物素辅基,生物素是丙酮酸羧化所必需的。

(2) 草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸

丙酮酸羧化生成的草酰乙酸经磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEP羧激酶)催化生成磷酸烯醇式丙酮酸(图15.11)。这个脱羧反应用GTP作为高能磷酰基的供体。磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶是单体酶,相对分子质量为70 000。在体内该反应是不可逆的,但在体外,分离的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶却可以催化该反应的逆反应。

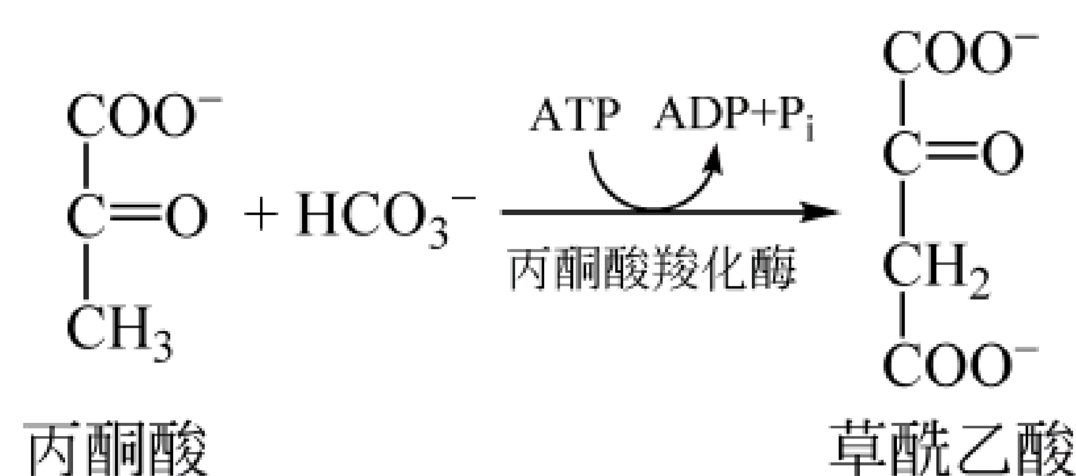


图15.10 丙酮酸羧化酶反应

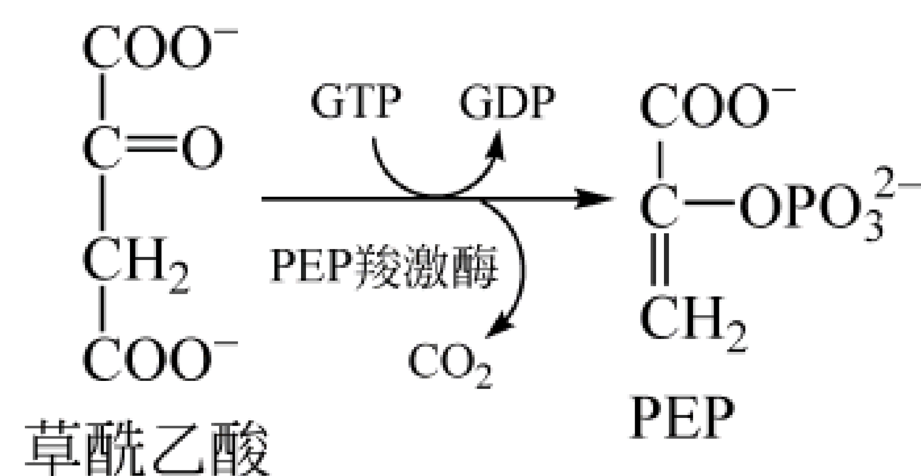


图15.11 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶反应

2. 旁路Ⅱ:果糖-1,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸

磷酸烯醇式丙酮酸和果糖-1,6-二磷酸之间的糖异生反应都是糖酵解途径中相应反应的逆反应,但果糖-1,6-二磷酸不能再沿着糖酵解的逆反应生成果糖-6-磷酸,因为糖酵解中由果糖-6-磷酸生成果糖-1,6-二磷酸的反应是由磷酸果糖激酶-1催化的不可逆反应。所以糖异生途径使用另一个果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase)催化果糖-1,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸,反应释放出大量的自由能,反应也是不可逆的(图15.12)。

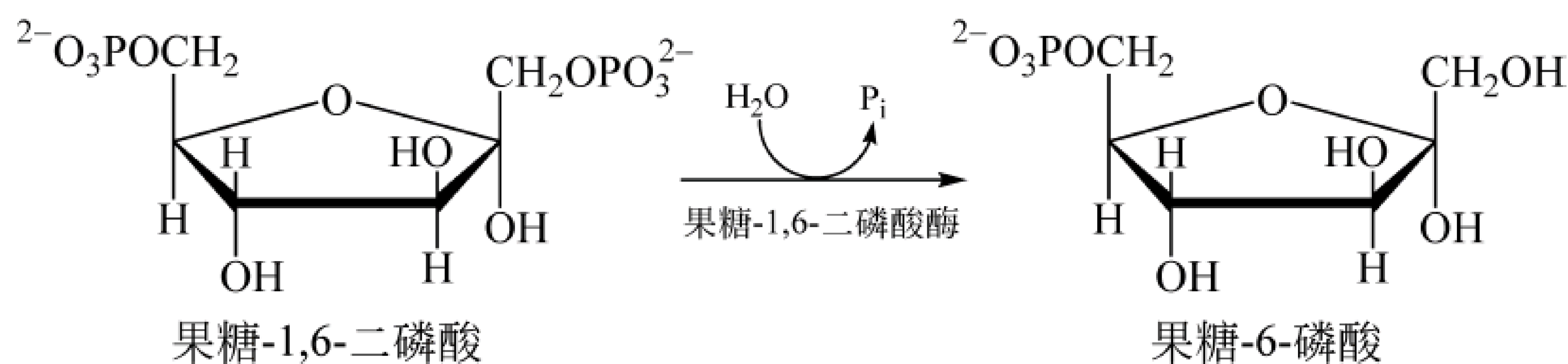


图15.12 果糖-1,6-二磷酸酶反应

果糖-1,6-二磷酸酶是相对分子质量为15 000的四聚体酶,表现出S形动力学曲线,受AMP以及调节分子果糖-2,6-二磷酸的别构抑制。但在糖酵解中,果糖-2,6-二磷酸是磷酸果糖激酶-1的激活剂,所以催化果糖-6-磷酸和果糖-1,6-二磷酸相互转换的2个酶受到果糖-2,6-二磷酸相反的调节。

3. 旁路Ⅲ:葡糖-6-磷酸水解生成葡萄糖

果糖-6-磷酸沿糖酵解的逆反应异构化生成葡糖-6-磷酸,但葡糖-6-磷酸水解为葡萄糖和无机磷酸则需要另一个葡糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase),反应是不可逆的(图15.13)。

葡糖-6-磷酸酶位于内质网,需要一个转运系统将葡糖-6-磷酸从胞液转运到内质网,水解反应后,还需要转运系统将葡萄糖和磷酸基团再转运回胞液。

从以上过程可以看出糖异生是个需能过程,由2分子丙酮酸合成1分子葡萄糖需要4分子ATP和2分子GTP,同时还需要2分子NADH,糖异生总反应为:

图 15.13 葡糖-6-磷酸酶反应

$$2\text{丙酮酸} + 4ATP + 2GTP + 2NADH + 2H^+ + 6H_2O \longrightarrow \text{葡萄糖} + 4ADP + 2GDP + 6P_i + 2NAD^+$$

糖异生等于用了 4 分子 ATP 克服由 2 分子丙酮酸形成 2 分子高能磷酸烯醇式丙酮酸的能障,用了 2 分子 ATP 进行磷酸甘油激酶催化反应的可逆反应。1 分子葡萄糖经糖酵解转化为 2 分子丙酮酸净生成 2 分子 ATP,而由 2 分子丙酮酸经糖异生途径合成 1 分子葡萄糖却消耗了 6 个 ATP,糖异生比糖酵解净生成的 ATP 多用了 4 分子 ATP。

然而糖异生具有重要的生理意义,在饥饿、剧烈运动造成糖原储备下降,血糖浓度降低后,糖异生可使糖酵解产生的乳酸、脂肪分解的甘油以及大部分氨基酸等代谢中间物重新生成糖。这对于维持血糖浓度,满足组织(特别是脑和红细胞)对糖的需要是十分重要的。

15.2.2 糖异生的前体

图 15.14 给出了糖异生的前体。经糖异生合成葡萄糖的主要前体物质有丙酮酸、柠檬酸循环的中间代谢物、三碳代谢中间物(例如甘油醛-3-磷酸)及二碳化合物,例如乙酰 CoA。细菌、原生生物、真菌、植物和某些动物可以利用乙醛酸途径将乙酰 CoA 转换为草酰乙酸经糖异生途径合成葡萄糖。植物可以通过将二氧化碳整合到二碳和三碳化合物中固定无机碳(如光合作用中描述的 Cavin 循环),这些化合物进入糖异生途径可净合成葡萄糖。对于哺乳动物而言,主要的糖异生前体是乳酸、大多数氨基酸和甘油。

图 15.14 糖异生的前体

乙醛酸途径、Calvin 循环、由 CO_2 合成乙酸以及瘤胃中微生物产生丙酸等代谢都不会在哺乳动物中发生

1. 乳酸

在红细胞和活跃的肌肉组织中糖酵解产生大量的乳酸,乳酸经血液转运到肝,在肝内经乳酸脱氢酶作用转换为丙酮酸。丙酮酸经糖异生途径合成葡萄糖,葡萄糖再经血液提供给红细胞、肌肉和其他组织作为能源。这一循环途径就是我们在糖酵解中已描述过的 Cori 循环。

2. 氨基酸

绝大多数氨基酸的碳骨架经分解代谢都可以转换为丙酮酸或柠檬酸循环的中间代谢物,这些代谢物都可直接经糖异生合成葡糖-6-磷酸,进而合成葡萄糖。在外周组织中糖酵解或氨基酸分解代谢产生的丙酮酸应当转运到肝,以便合成葡萄糖。在肌肉组织中丙酮酸转换为乳酸后可以经 Cori 循环进入肝,然后在肝细胞中再转换回丙酮酸。此外,还存在一个类似 Cori 循环的转运系统——葡糖-丙氨酸循环(图 15.15)。

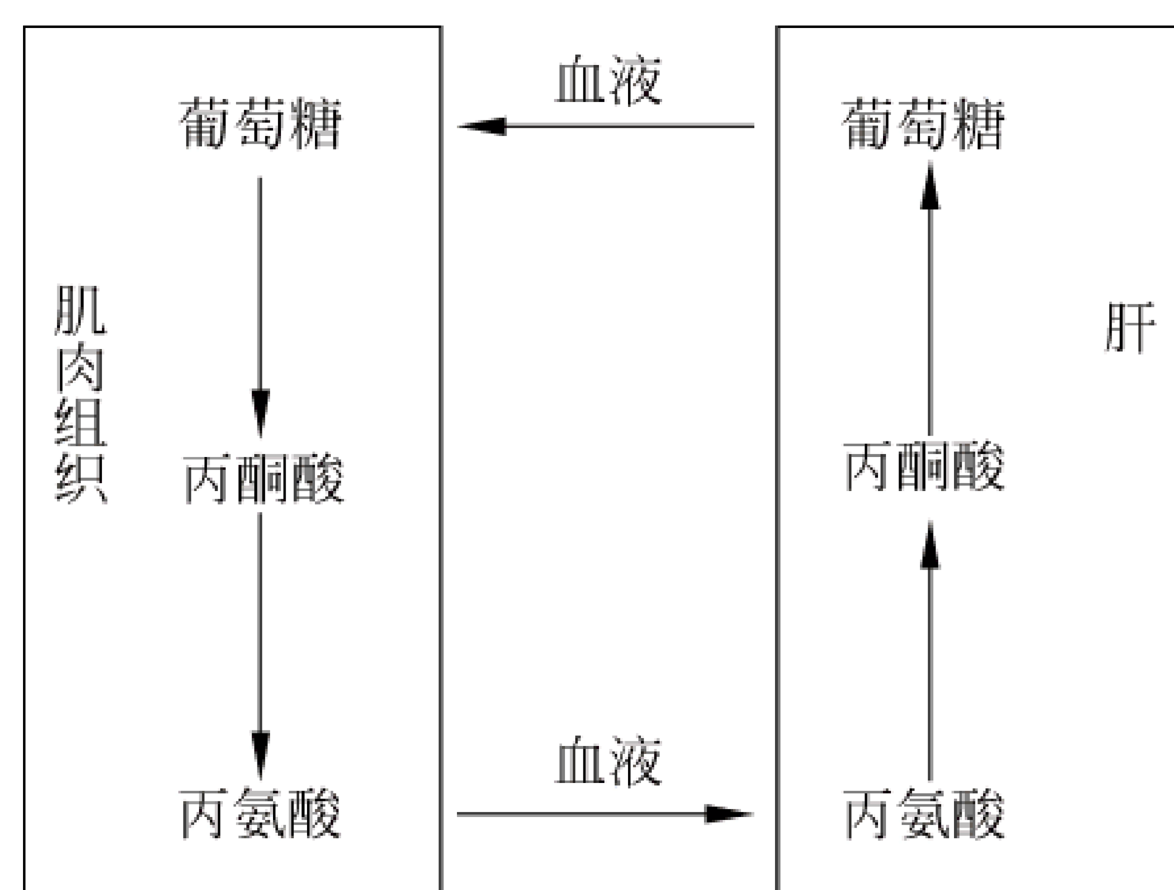


图 15.15 葡糖-丙氨酸循环

在外周组织中丙酮酸也可以经转氨作用接收来自一个氨基酸(例如谷氨酸)的氨基,形成丙氨酸。然后丙氨酸被转运到肝,在肝内,经转氨作用丙氨酸将氨基再转给一个 α-酮酸后重新形成丙酮酸用于糖异生。

另外,天冬氨酸也是一个经糖异生合成葡萄糖的前体。天冬氨酸可经转氨作用直接生成草酰乙酸,也可经柠檬酸循环途径先形成延胡索酸,再经苹果酸合成草酰乙酸。

3. 甘油

三酰甘油分解代谢可生成甘油和乙酰 CoA,乙酰 CoA 在植物经乙醛酸循环可成为糖异生的前体。甘油需要磷酸化形成甘油-3-磷酸,然后转换成磷酸二羟丙酮后就可进入糖异生途径。有关甘油代谢在脂代谢一章还将描述。

4. 丙酸

反刍动物(例如牛、羊、鹿和骆驼)在消化饲料时,瘤胃中微生物产生的丙酸和乳酸就可进入糖异生途径。丙酸被转换为丙酰 CoA,然后转换为琥珀酰 CoA。琥珀酰 CoA 经柠檬酸循环转换为草酰乙酸。来自瘤胃的乳酸被氧化为丙酮酸,成为糖异生的前体。

5. 乙酸

许多生物利用乙酸作为其主要碳源。利用过程中可以将乙酸转换为乙酰 CoA,经乙醛酸途径合成草酰乙酸,然后经糖异生途径合成葡萄糖。细菌和单细胞真核生物,例如酵母就是用乙酸作为前体经糖异生合成葡萄糖的。某些细菌能够直接由 CO_2 合成乙酸。

15.2.3 糖异生的调控

体内糖异生受到严格调控,主要调控发生在由丙酮酸经由草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸糖和果糖-1,6-二磷酸转化为果糖-6-磷酸两个反应。图 15.16 给出了一些代谢物对糖异生和糖酵解的调控。

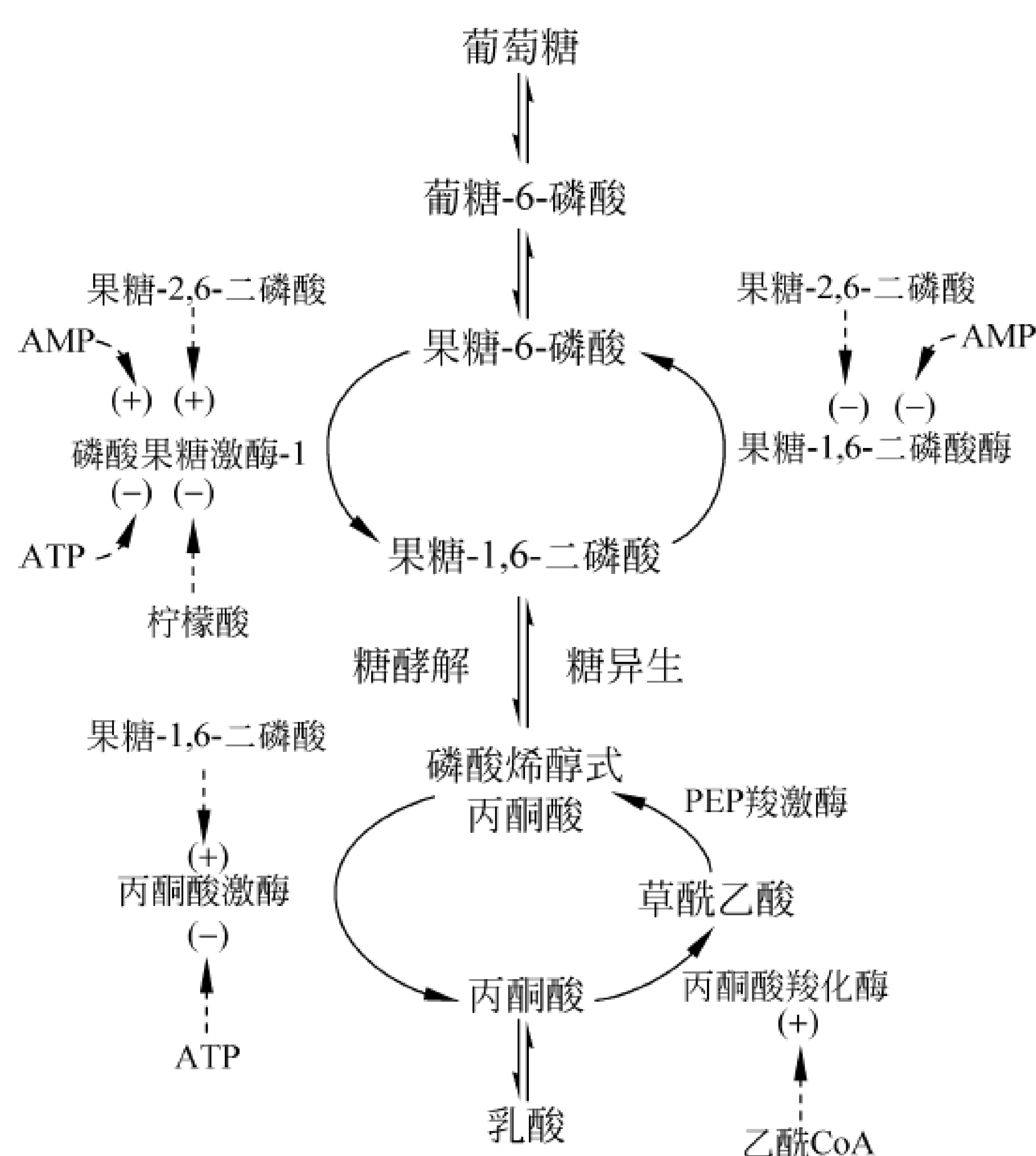


图 15.16　代谢物对糖异生和糖酵解的调控

(＋)表示激活；(－)表示抑制

糖酵解和糖异生虽说是共用某些酶的分解和合成两个相反代谢途径，但有些反应对每一条代谢途径都是惟一的。例如磷酸果糖激酶-1 只催化糖酵解的一个反应，而在糖异生途径中果糖-1，6-二磷酸酶催化它的逆反应，两个反应在代谢上是不可逆的，在任一给定时间只有其中的一个酶处于活性状态。例如，抑制磷酸果糖激酶-1 就会刺激糖异生，使得更多的葡糖-6-磷酸生成葡萄糖，而不是转化为果糖-1，6-二磷酸。同样，调控果糖-1，6-二磷酸酶也可以调控果糖-1，6-二磷酸是转向糖酵解或是糖异生，所以调控任一个酶都可改变通过两个相反途径的物质流量。

在糖酵解调控中提到的果糖-2，6-二磷酸是个别构效应剂，它激活磷酸果糖激酶-1，促进糖酵解；抑制果糖-1，6-二磷酸酶，不利于糖异生。一个双功能酶磷酸果糖激酶-2 既催化由果糖-6-磷酸生成果糖-2，6-二磷酸的反应，又催化果糖-2，6-二磷酸水解去磷酸重新生成果糖-6-磷酸，控制着果糖-2，6-二磷酸的稳态浓度，是糖酵解和糖异生之间的转换开关。

相关话题　糖尿病患者当心白内障

从已描述的葡萄糖代谢了解到，在大多数动物中，无论来自糖异生，饮食还是糖原降解的葡萄糖通常都可被氧化或重新整合到糖原中。然而，在包括人在内的一些哺乳动物的组织(如睾丸、胰腺、脑和眼睛中晶状体等)中，葡萄糖经醛糖还原酶催化转换为山梨醇，然后在多元醇脱氢酶催化下可生成某些细胞(如精细胞)必需的果糖(图 15.17)。

由于醛糖还原酶对葡萄糖的 K_m 值高，因此流经这个途径的葡萄糖流量很低，通常情况下葡萄糖都是经糖酵解途径代谢。当葡萄糖浓度比通常流量高时，例如糖尿病患者，在患者

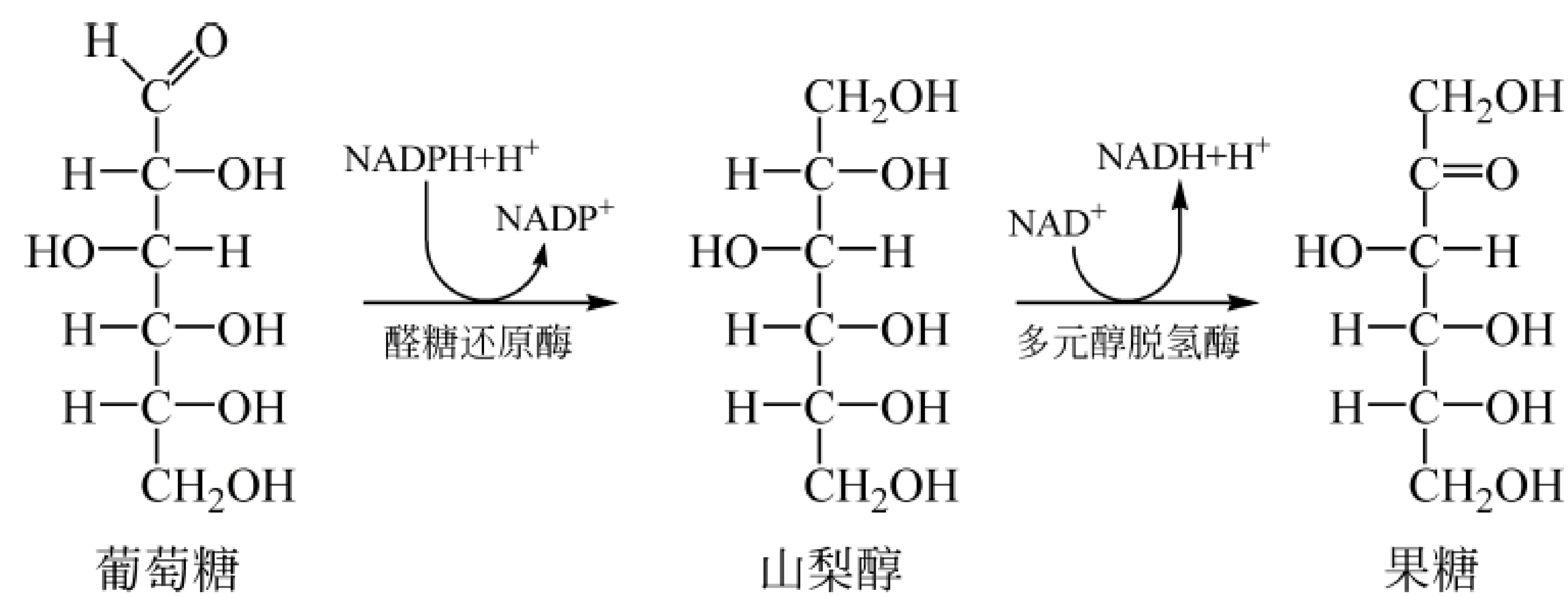


图 15.17　葡萄糖转换为山梨醇反应

的晶状体就会有更多的山梨醇生成。由于晶状体内多元醇脱氢酶活性比醛糖还原酶低,因此可能造成山梨醇堆积。因为膜对山梨醇的通透性差,结果使得细胞的渗透压发生改变,引起晶状体蛋白凝聚和沉淀,导致白内障(晶状体中的混浊区)。

小结

1. 在糖原磷酸化酶催化下,由糖原的非还原端连续进行磷酸解,绝大多数葡萄糖残基生成葡糖-1-磷酸,然后葡糖-1-磷酸转换为葡糖-6-磷酸。

2. 利用糖原引物和 UDP-葡糖,糖原合酶催化糖原的合成。

3. 糖原降解和糖原合成受到激素相反的调控。激酶和磷酸酶调控转换酶—糖原磷酸化酶和糖原合酶的活性。

4. 糖异生是一个由非糖类前体物质合成葡萄糖的途径。糖异生中主要反应也发生在胞质溶胶中,其中7步反应是糖酵解的逆反应。糖异生中特殊的四种酶催化绕过糖酵解中3个代谢上不可逆反应的旁路反应。

5. 非糖类前体包括丙酮酸、乳酸、丙氨酸和甘油。

6. 糖异生受到胰高血糖素、别构调节剂和它的底物浓度的调控。

习题

1. 完全缺乏肌糖原磷酸化酶(McArdle 病)的人由于肌肉痉挛而不能进行剧烈运动,与正常人相比,运动会使这些患者细胞内的 ADP 和 P_i 水平增加很多,而且他们肌肉内也不像正常人那样由于运动会产生乳酸堆积。对于这种现象给出你的解释。

2. 由于特殊酶缺陷,糖原贮积症(GSDs)影响糖原储存和血糖之间的平衡,预测下列每种疾病对(1)储存的肝糖原量和(2)血糖水平的影响。

(a) 冯吉尔克(Von Gierke)病:缺乏果糖-6-磷酸酶。

(b) 科里(Cori)病:缺乏淀粉-1,6-葡糖苷酶(去分支酶的一种活性)。

(c) 埃尔(Her)病:缺乏肝糖原磷酸化酶。

3. 假如你正计划进行艰苦的远足运动,(a)朋友们建议你在出发前几天食用大量的高

糖食物，比如馒头和面包等，请问他们的建议有何依据？(b)如果不是提前几天吃，而是就在远足开始前立即食用精制糖含量高的棒糖有没有益处？

4. (a) 为什么由葡糖-6-磷酸合成糖原所需的能量要比由糖原降解至葡糖-6-磷酸获得的能量多？

(b) 在运动期间，肌细胞和肝细胞两者中的糖原都可转换为葡萄糖，并在肌肉组织中经代谢产生 ATP。肝糖原和肌糖原提供给肌肉组织的 ATP 量相同吗？

5. (a) 葡糖-丙氨酸循环是怎样使肌肉中的丙酮酸用于肝中糖异生，然后又以葡萄糖形式转回到肌肉的？

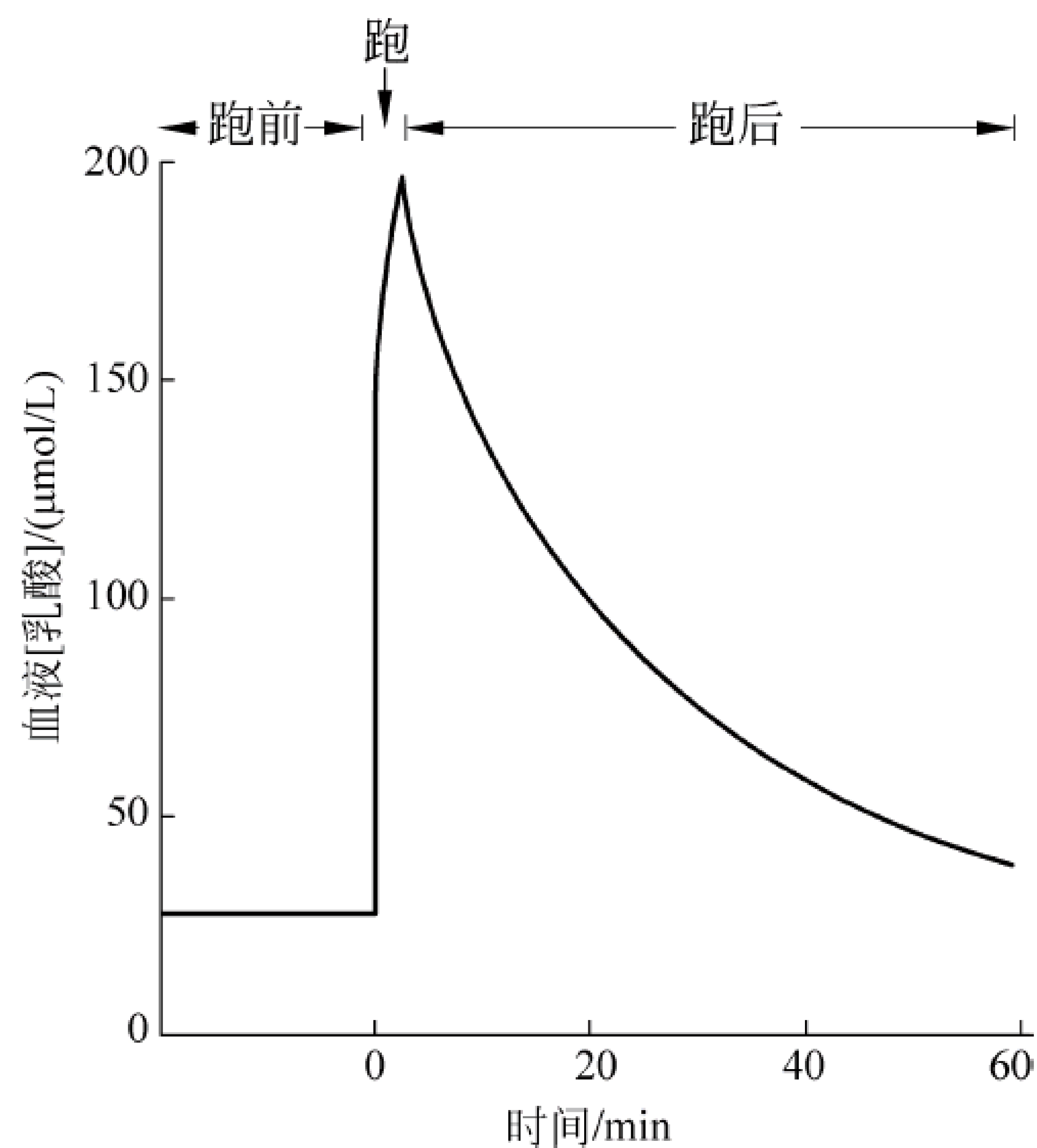
(b) 为什么葡糖-丙氨酸循环最终提供给肌肉的能量要比 Cori 循环提供的能量多？

6. 下图为一个运动员跑 400m 之前、途中、之后，血浆中乳酸浓度随时间的变化曲线。

(a) 为什么乳酸的浓度会迅速上升？

(b) 赛跑过后是什么原因使乳酸浓度降下来？为什么下降的速率比上升的速度缓慢？

(c) 当处于休息状态下，乳酸的浓度为什么不等于零？



7. 在(a)饥饿和(b)剧烈运动条件下，糖原储备耗尽后主要的糖异生前体是什么？

8. 为什么酗酒或长期饮酒的人有可能导致低血糖？

9. 由丙酮酸开始的糖异生过程中需要柠檬酸循环的什么重要产物？

10. 鸡蛋清中的抗生物素蛋白对生物素的亲和力极高，如果将该蛋白加到肝提取液中，对丙酮酸经糖异生转化为葡萄糖有什么影响？

16　电子传递与 ATP 合成

本章将描述一个生物化学中最复杂的一个代谢途径——膜结合的电子传递与 ATP 合成偶联途径。这个途径能够将还原当量 NADH 和 $FADH_2$ 转化为 ATP。由于葡萄糖和乙酰 CoA 的氧化与 NAD^+ 和 FAD 的还原偶联，所以在糖酵解和柠檬酸循环中看到的产物是还原当量 NADH 和 $FADH_2$。在这一章中将了解到 NADH 和 $FADH_2$ 随后再被氧化，电子通过膜结合的电子传递系统释放能量，这些能量可使 ADP 磷酸化为 ATP。电子通常传递给最终电子受体分子氧（O_2），这也是我们通常将整个过程称为氧化磷酸化的缘故。在真核生物中，氧化磷酸化发生在线粒体，原核生物中发生在质膜。

16.1　电子传递与 ATP 合成途径概述

在真核生物中电子传递与 ATP 合成过程发生在线粒体，柠檬酸循环以及脂肪酸氧化和氨基酸降解代谢也发生在线粒体，这些代谢反应产生的还原型辅酶可直接进入电子传递与 ATP 合成途径（图 16.1）。然而，糖酵解在胞质溶胶中生成的还原型辅酶则需经转运系统进入线粒体的氧化磷酸化途径。

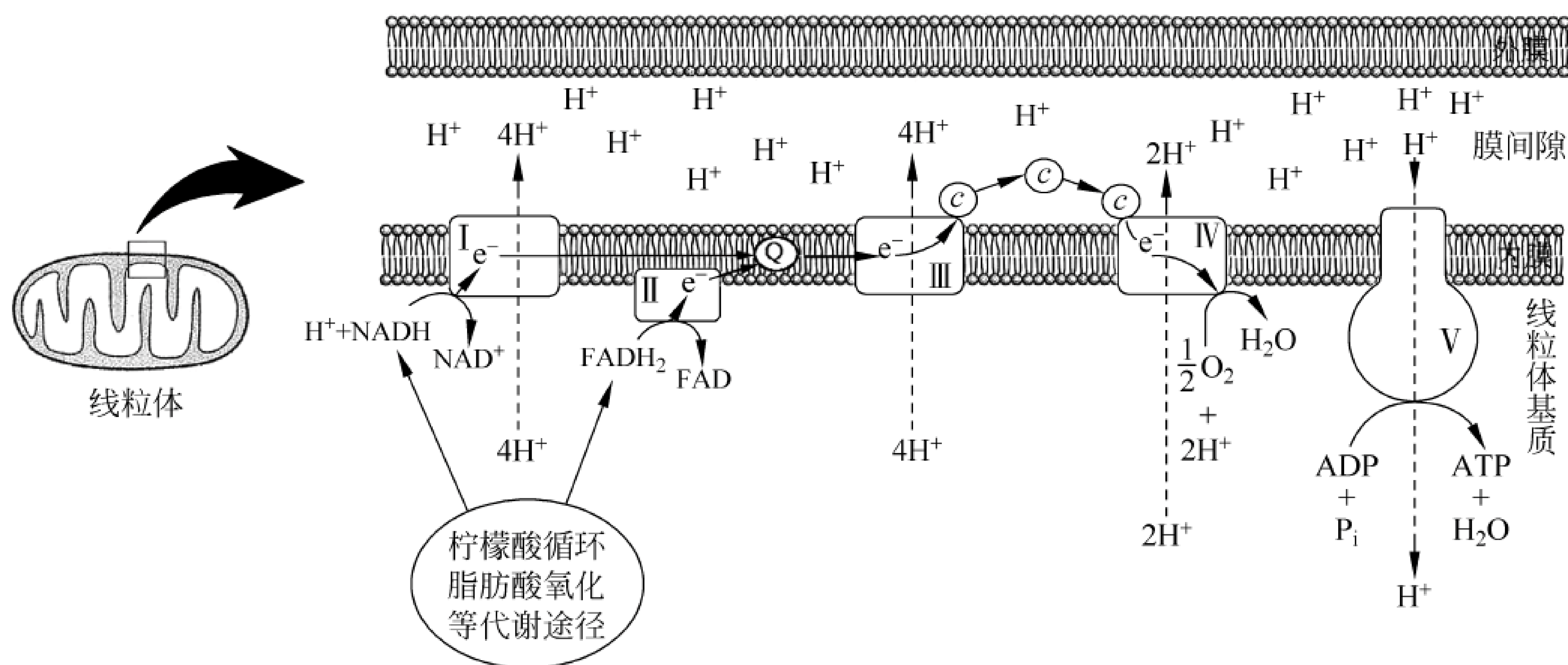


图 16.1　电子传递和 ATP 合成途径概图

复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ构成电子传递链，复合物Ⅴ是由 H^+ 驱动的 ATP 合成部位

Q 代表辅酶 Q，也称为泛醌，*c* 代表细胞色素 *c*

16.1.1 氧化磷酸化特征

从图 16.1 可以看到,电子传递与 ATP 合成是 2 个紧密偶联的过程,主要有 2 个特征。

(1) NADH 和 $FADH_2$ 通过电子传递链被氧化,重新生成 NAD^+ 和 FAD

电子传递链(electrontransport chain),也称为呼吸电子传递链(respiratory electrontransport chain)由一系列嵌入到线粒体内膜的复合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组成。来自 NADH 的电子经这些复合物依次传递,最终传递给电子受体——分子氧 O_2,而来自 $FADH_2$ 的电子经复合物Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ传递给 O_2,O_2 被还原生成水。

当电子通过复合物传递时,产生的能量将线粒体基质内的质子(H^+)转移到膜间隙,产生跨线粒体内膜的质子浓度梯度。

(2) 质子浓度梯度可作为自由能库,驱动 ADP 磷酸化生成 ATP

质子通过另一嵌膜复合物 V—ATP 合酶通道返回到基质。当质子顺质子浓度梯度回到线粒体基质时,ATP 合酶催化 ADP 磷酸化生成 ATP。

16.1.2 化学渗透理论

电子传递产生的质子浓度梯度作为能量库驱动 ATP 合成的氧化磷酸化机制称为化学渗透理论(chemiosmotic theory),最初是由 Peter Mitchell 于 1961 年提出来的。当时有关细胞通过什么样的机制进行氧化磷酸化是个热门研究并存在许多争议的课题,那时人们还不清楚氧化反应与 ADP 磷酸化是怎样偶联的。许多早期的研究试图证实存在一个能够将磷酰基团转移到 ADP 上的"高能"磷酸化代谢物,但都以失败告终。今天,我们要感谢许多科学家数十年的工作,质子浓度梯度形成和消失作为生物能学的中心模式理论已经被人们所接收。Mitchell 也因为在生物能学方面的贡献获得了 1978 年的诺贝尔化学奖。

在 Mitchell 提出化学渗透假说之前,已经积累了许多物质氧化及线粒体电子载体循环氧化和还原的信息。而氧化与 ADP 磷酸化偶联起初得到实验证实应是 1956 年 Britton Chance 和 Ronald Williams 的发现。一个悬浮在磷酸缓冲液的完整的线粒体只有当加入 ADP 时才能氧化底物和消耗氧。换言之,一个底物的氧化是与 ADP 磷酸化偶联的。实验不仅表明呼吸过程可快速进行,直至所有的 ADP 都磷酸化为止,而且也表明消耗的 O_2 量取决于所加的 ADP 量(图 16.2)。

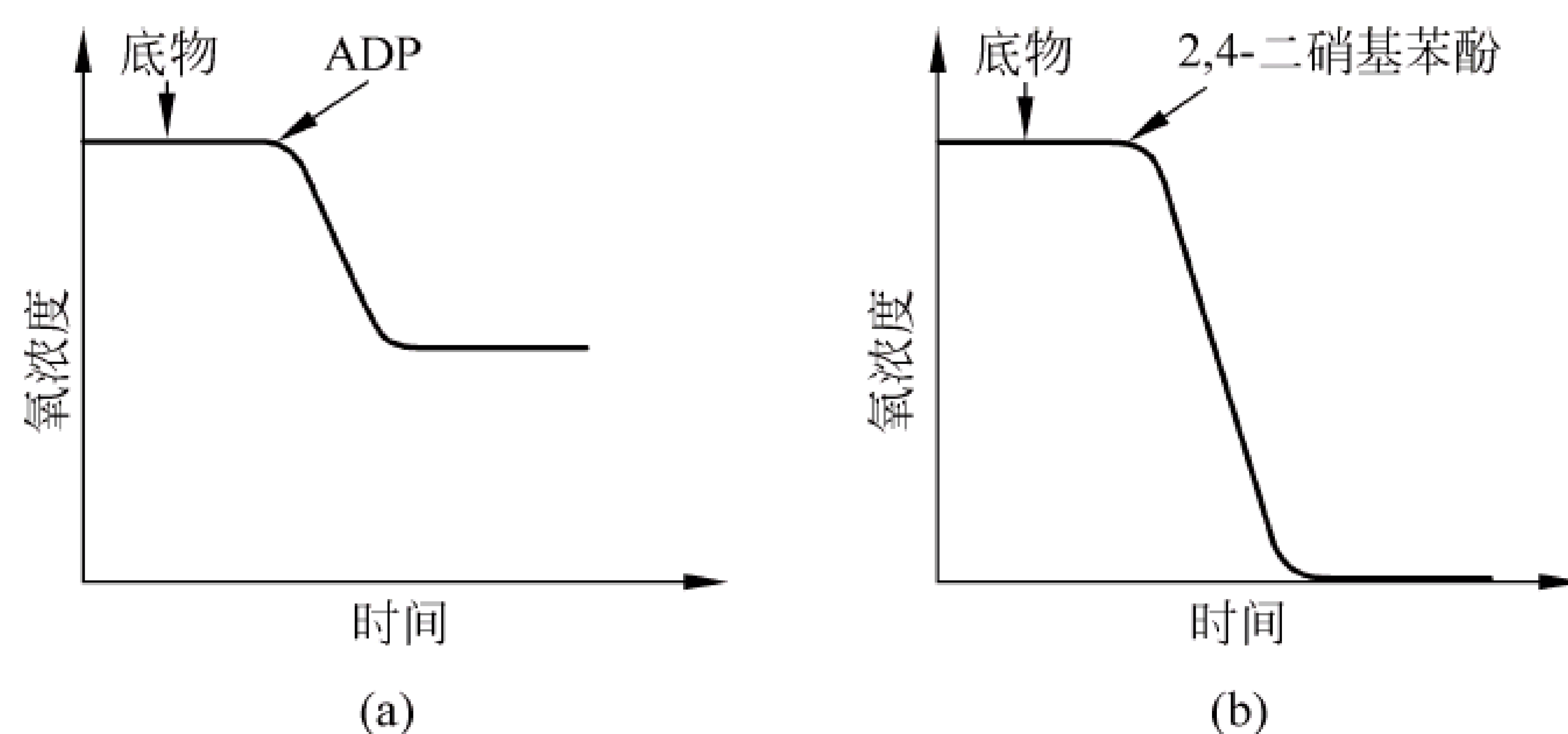


图 16.2 线粒体中氧的呼吸

(a) 在有过量 P_i 和底物存在下,只有当加入 ADP 后,一个完整线粒体才快速消耗氧,当所有的 ADP 都磷酸化后,氧消耗停止;(b) 当不加 ADP,而加入解偶联剂 2,4-二硝基苯酚时,仍可进行底物的氧化,即氧快速消耗

是否是质子浓度梯度驱动 ADP 磷酸化,解偶联现象提供了很关键的线索。人们已经知道在不加 ADP,而加入像 2,4-二硝基苯酚那样的脂溶性弱酸情况下,底物氧化可进行到所有氧都被消耗为止,但在底物的氧化过程中并没有发生 ADP 磷酸化(图 11.3)。这种解偶联现象说明解偶联剂可结合质子跨过线粒体内膜进入基质,破坏了电子传递产生的质子梯度,使得驱动 ATP 合成的动力消失。这也证明了 Mitchell 的质子浓度梯度驱动 ATP 合成的化学渗透理论。

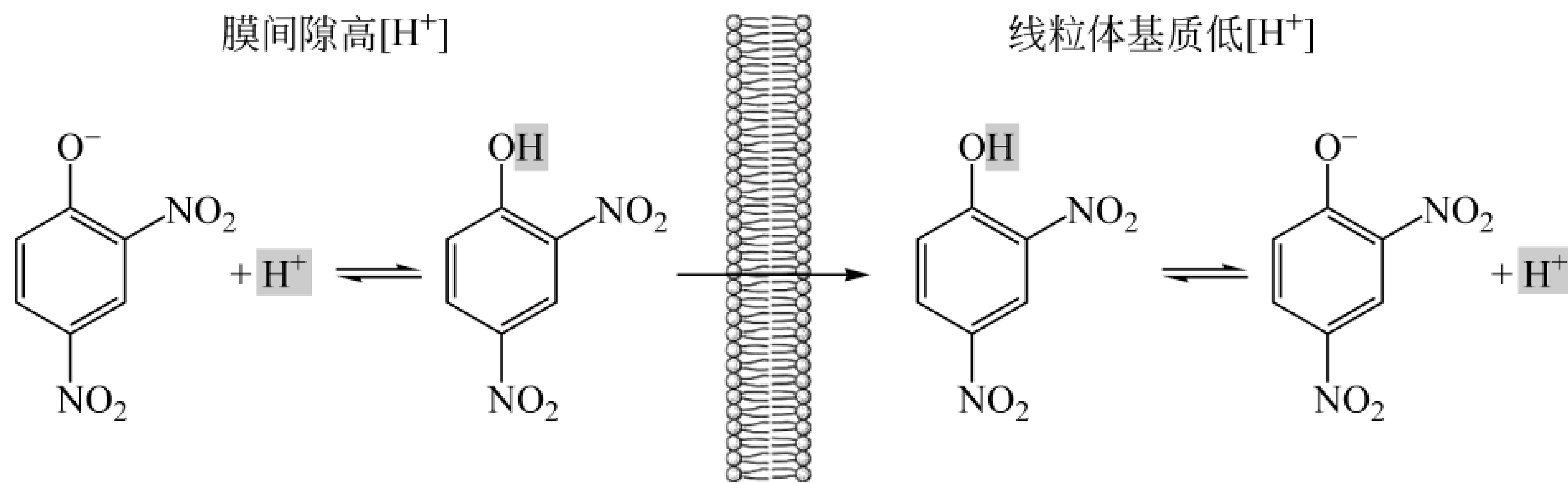


图 16.3　2,4-二硝基苯酚的解偶联作用

16.1.3　质子势

在第 7 章膜转运一节中曾描述过,对于任一个带点荷分子跨膜转运过程的自由能变化都应当考虑到化学(浓度)和电(带电荷)两种效应的影响。因此,转运过程的 ΔG 应表示为:

$$\Delta G_{转运} = zF\Delta\psi + 2.303RT\lg([\mathrm{A}_{内}]/[\mathrm{A}_{外}])$$

式中第一项 $zF\Delta\psi$ 表示由跨膜电位差引起的自由能变化,而第二项为膜两侧浓度梯度导致的自由能变化。对于跨膜转运的质子,每分子的电荷数为 1.0($z=1$),因此该质子梯度的整个自由能变化为:

$$\begin{aligned}\Delta G &= F\Delta\psi + 2.303RT\lg([\mathrm{H}^+]_{基质}/[\mathrm{H}^+]_{膜间隙}) \\ &= F\Delta\psi + 2.303RT(\mathrm{pH}_{基质} - \mathrm{pH}_{膜间隙}) \\ &= F\Delta\psi + 2.303RT\Delta\mathrm{pH}\end{aligned}$$

可以利用这个方程计算出跨膜的质子梯度和电位差产生的质子(动)势(protonmotive force,pmf)。显然质子势就是由富含能量的质子梯度所形成的总电化学电位,等于膜两侧质子浓度梯度与电位差产生的自由能变化之和。肝线粒体中膜电位差($\Delta\psi$)为-0.17V(基质为负),而 ΔpH 等于-0.5($\mathrm{pH}_{膜间隙}-\mathrm{pH}_{基质}$),代入方程中得到:

$$\begin{aligned}\Delta G &= [96485\times(-0.17)]\mathrm{J/mol} + [2.303\times 8.315\times 310\times(-0.5)]\mathrm{J/mol} \\ &= -16402\mathrm{J/mol} - 2968\mathrm{J/mol} \\ &= -19.4\mathrm{kJ/mol}\end{aligned}$$

结果表明 1mol 质子跨膜返回线粒体基质伴随着-19.4kJ/mol 自由能变化,其中 85%自由能变化源于跨膜的电位差[$(-16.4)/(-19.4)=85\%$],只有 15%是由质子浓度梯度产生的[$(-3)/(-19.4)=15\%$]。

已知合成一分子 ATP 需要的标准自由能变化约为 32kJ/mol,而实际上约需要-48kJ/mol。因此为了驱动一分子 ATP 合成至少应当将 3 个质子转移到基质[$3\times(-19.4\mathrm{kJ/mol})=-58.2\mathrm{kJ/mol}$]。要注意的是:要转移一个质子,制造质子梯度需要的能量是$+19.4$kJ/mol。

16.2　电子传递

现在转向膜结合的电子传递链的各个具体反应。电子传递链由复合物Ⅰ、复合物Ⅱ、复合物Ⅲ和复合物Ⅳ组成，每种酶复合物催化电子传递过程中的一个独立反应。这 4 个复合物都是位于线粒体内膜或细菌质膜中的酶复合物，利用去污剂仔细溶解膜，这些复合物都能够以活性形式从膜上分离出来。我们首先简单描述电子传递的顺序，实际上就是电子传递链的组成，然后再具体描述发生在各个酶复合物的反应。

16.2.1　电子传递顺序

电子传递是将来自还原型辅酶 NADH（或 $FADH_2$）的电子通过电子传递链传递给 O_2 的过程。研究证明电子按照还原电位由低到高的方向通过电子传递链中的复合物Ⅰ～Ⅳ（图 16.4）。这 4 种酶复合物中除了含有像 FAD、FMN 和泛醌（Q）那样的辅助因子作为氧化还原中心外，还含有像 Fe-S 族、细胞色素以及铜蛋白那样的蛋白氧还中心。随着这些氧还中心依次进行氧化和还原反应，电子从一个还原剂传递到 1 个氧化剂。Q 和细胞色素 c 像位于电子传递链复合物之间的纽带。Q 将电子由复合物Ⅰ和复合物Ⅱ转移至复合物Ⅲ，细胞色素 c 将电子由复合物Ⅲ传递给复合物Ⅳ。

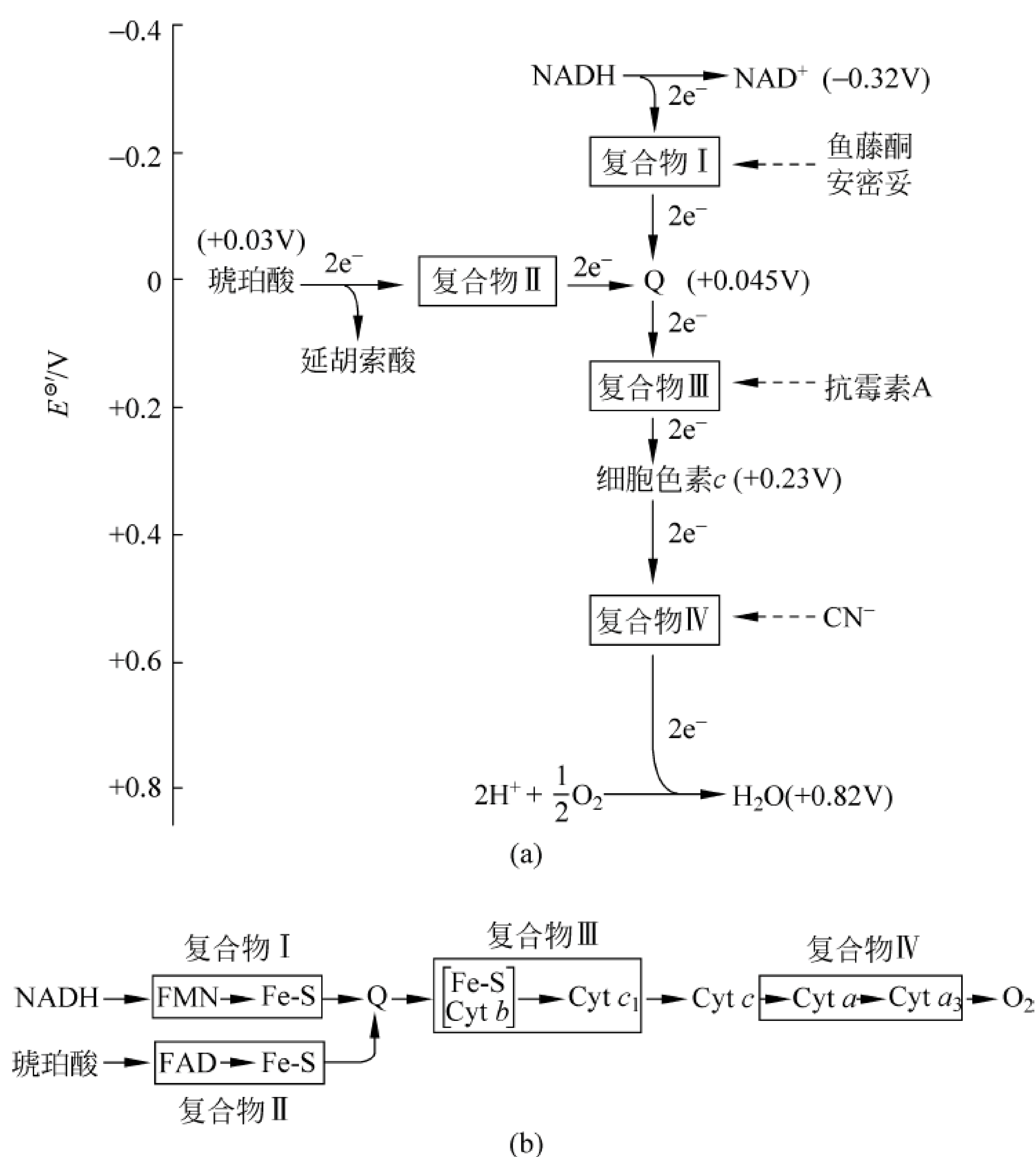


图 16.4　电子传递

（a）电子传递顺序；（b）电子传递中的辅助因子

图中虚线箭头所指分别为鱼藤酮和安密妥、抗霉素及 CN^- 抑制电子传递的部位

另外,图16.4还给出了几种可阻断电子传递的化合物鱼藤酮、安密妥、抗霉素和氰化物CN。研究人员通过将这些化合物加到线粒体悬浮液中,通过测定O_2的消耗率,证实鱼藤酮或安密妥可阻断复合物Ⅰ;抗霉素阻断复合物Ⅲ;氰化物CN^-阻断复合物Ⅳ中的电子传递。由于电子传递被阻断,显然O_2的消耗率也就降低了。当将琥珀酸加入到被鱼藤酮阻断的线粒体悬浮液中,电子传递和消耗都又得到恢复,这一实验又揭示了电子传动链的另外一个复合物Ⅱ入口。

表16.1给出了电子传动链中复合物Ⅰ～Ⅳ内的底物和辅助因子的标准还原电位,由负值到正值,一般来说,每种底物或中间物都是被具有更正值$E^{\ominus\prime}$的另外辅助因子或底物氧化。底物和辅助因子的还原电位是确定电子传动链中电子载体实际排序的一个依据。

表16.1　线粒体氧还中心成员的标准还原电位

复合物中氧还中心成员和底物	还原电位($E^{\ominus\prime}$)
NADH	−0.32
复合物Ⅰ	
FMN	−0.30
Fe-S簇	−0.25～−0.05
延胡索酸	+0.03
复合物Ⅱ	
FAD	0.0
Fe-S簇	−0.26～0.00
QH_2/Q	+0.04
复合物Ⅲ	
Cyt b_L	−0.01
Cyt b_H	+0.03
Fe-S簇	+0.28
Cyt c_1	+0.22
Cyt c	+0.22
复合物Ⅳ	
Cyt a	+0.21
Cu_A	+0.24
Cyt a_3	+0.39
Cu_B	+0.34
$\frac{1}{2}O_2+2H^++2e^-\longrightarrow H_2O$	+0.82

科学家通过使用特异抑制剂,并结合各个氧化还原成员的标准还原电位,基本上确定了电子传递的顺序。

16.2.2　复合物Ⅰ

复合物Ⅰ系统命名为NADH-Q氧化还原酶(NADH-ubiquinone oxidoreductase),也称为NADH脱氢酶。复合物Ⅰ是由约45个独立多肽链组成的嵌膜的多亚基复合物,含有紧密结合的辅基FMN和8个Fe-S族。复合物Ⅰ接收来自NADH的电子,催化泛醌(Q)还原为泛醇(QH_2)的反应(图16.5)。总反应为:



$$NADH + H^+ + Q \longrightarrow NAD^+ + QH_2 \quad \Delta E^{\ominus\prime} = 0.360V, \quad \Delta G^{\ominus\prime} = -69.5kJ/mol$$

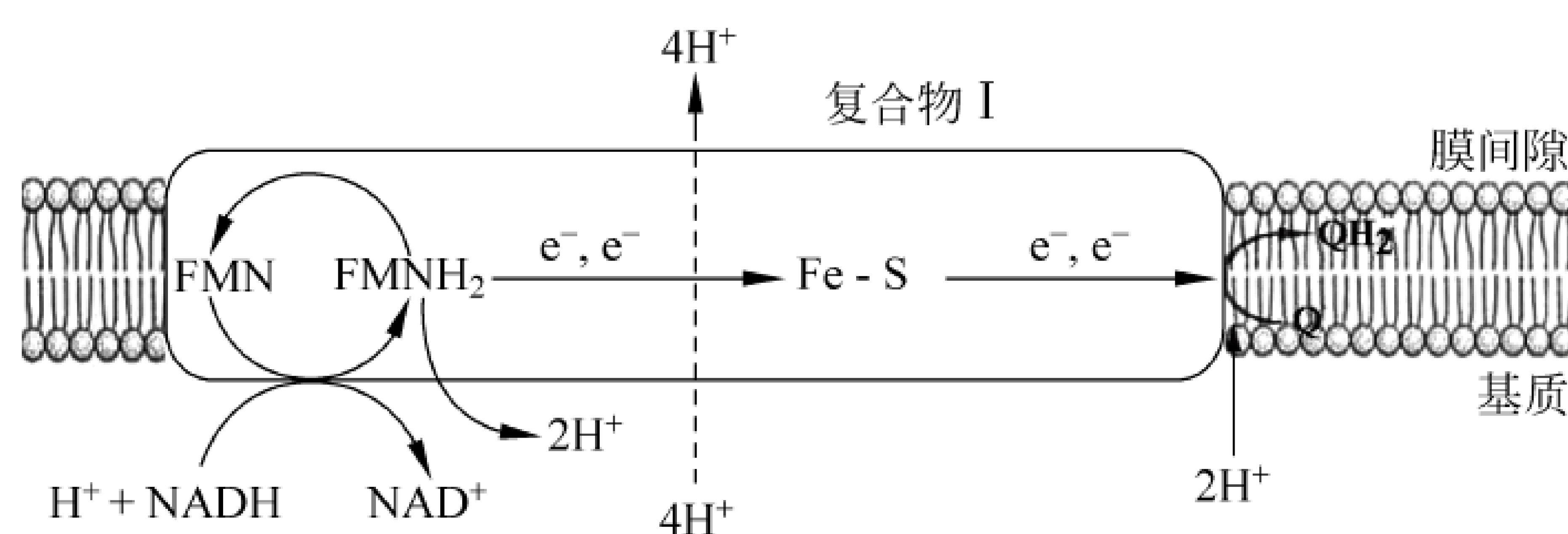


图 16.5 复合物 I 中电子传递和质子转移

首先来自 $NADH + H^+$ 的 2 个电子和 $2H^+$ 转移给 FMN，生成 $FMNH_2$，然后电子再传递给 Fe-S 簇（Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+}），2 个 H^+ 释放到基质中。最后，来自 Fe-S 簇的电子（Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+}）传给 Q（每次传递 1 个电子），经过中间产物半醌（QH·）最后生成 QH_2（图 16.6）。

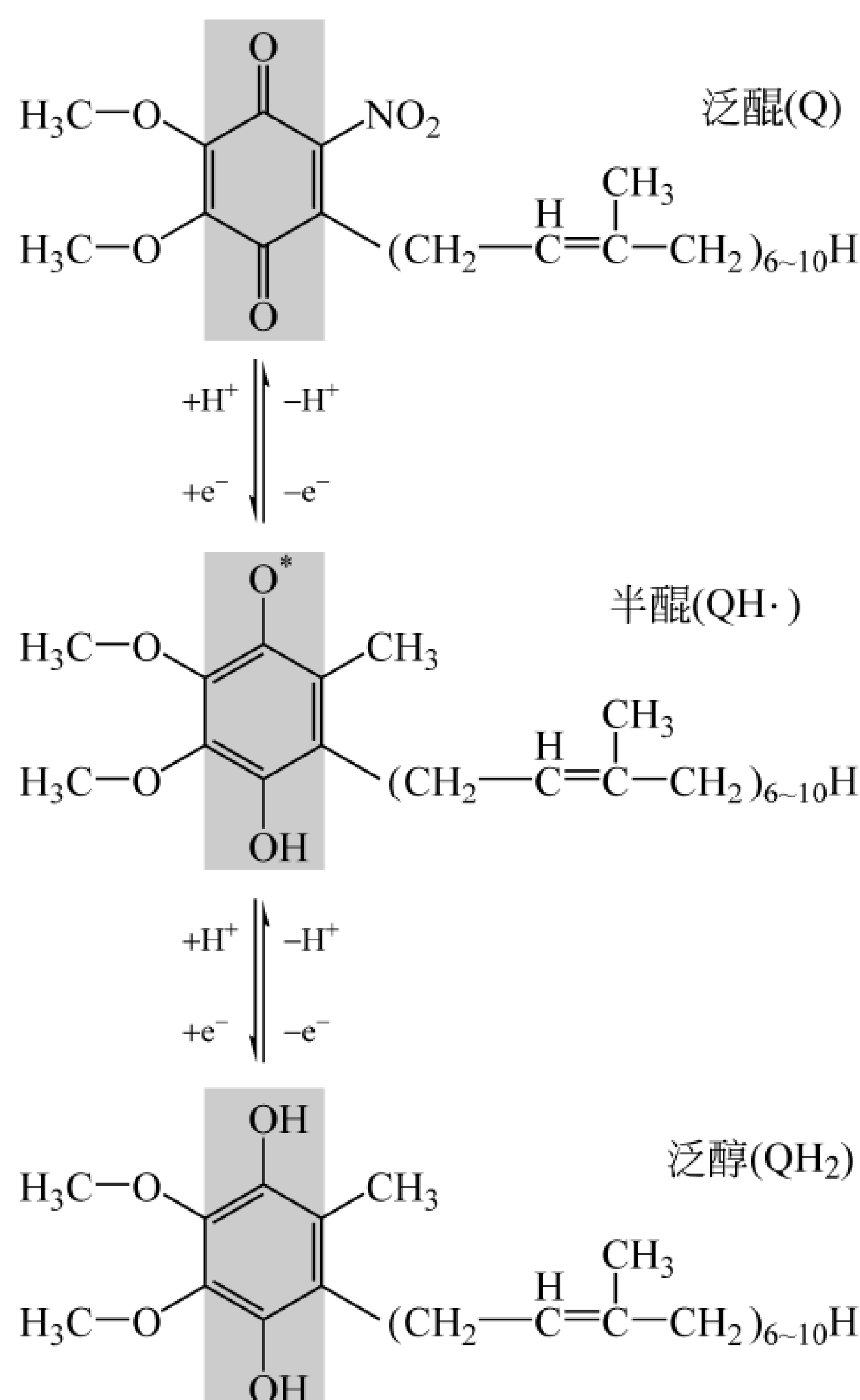


图 16.6 泛醌的 3 种氧化状态

Q 经 QH·完全被还原为 QH_2

Fe-S 簇是铁-硫蛋白的辅基，主要有[2Fe-2S]和[4Fe-4S]两种类型，不仅复合物 I 中含有，而且复合物 II 和复合物 III 中也含有（图 16.7）。Fe-S 簇中的铁和无机硫化物（S^{2+}）与 Fe-S 蛋白中半胱氨酸残基的巯基螯合。Fe-S 簇中的三价铁离子（Fe^{3+}）和二价铁离子（Fe^{2+}）之间进行还原和氧化转换时，每个 Fe-S 簇能够接收或给出 1 个电子。

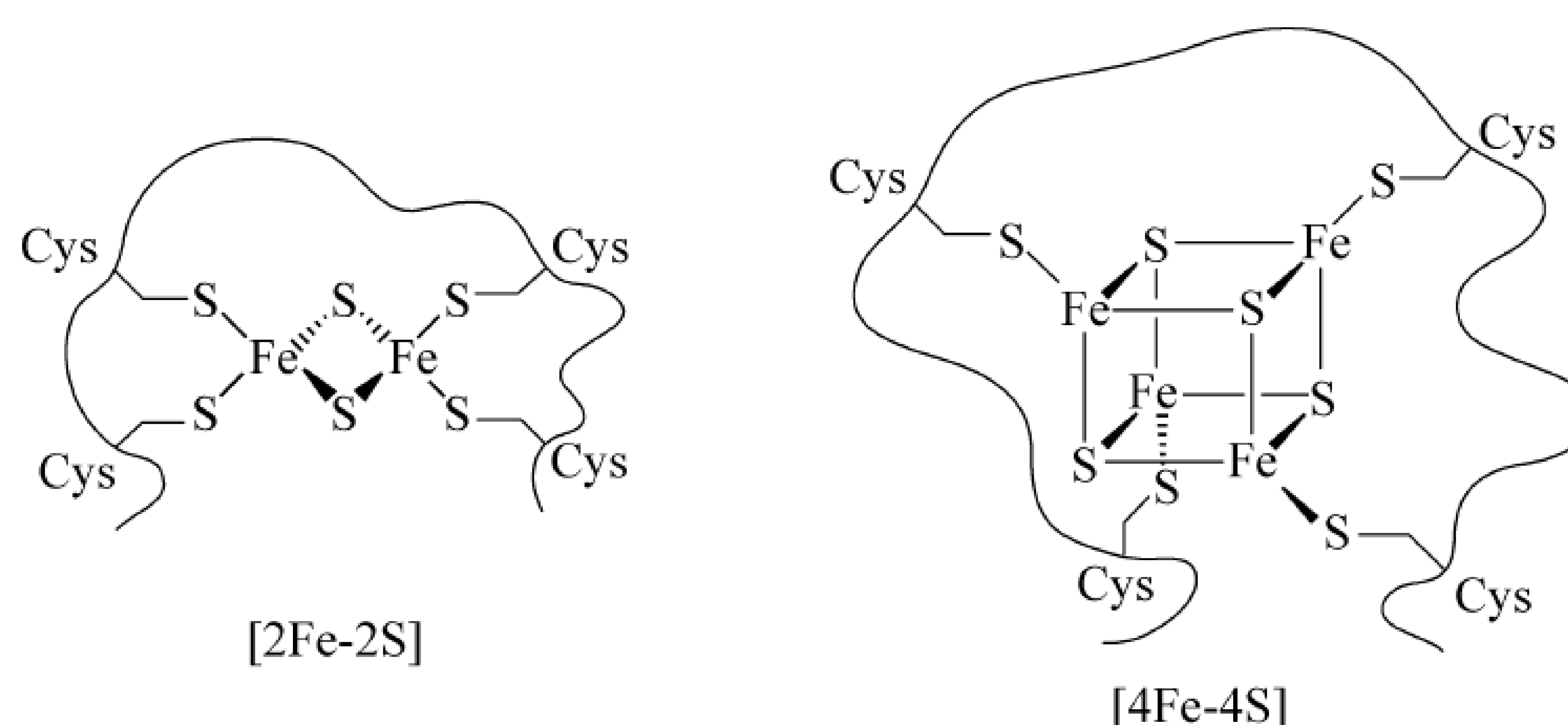
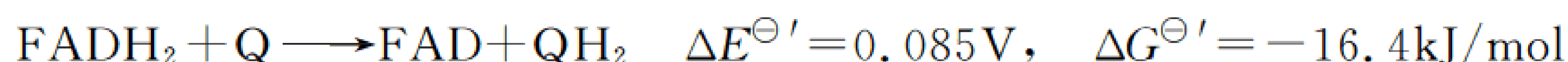


图 16.7 [2Fe-2S]和[4Fe-4S]两种类型 Fe-S 簇

在电子通过复合物Ⅰ传递时释放出的－69.5kJ/mol 能量并没有直接用于驱动一个 ADP 磷酸化为 ATP,而是将 H^+ 从基质转移到膜间隙。研究表明每从 NADH 转移一对电子给 Q,就将有 4 个质子被转移到膜间隙。

16.2.3 复合物Ⅱ

复合物Ⅱ系统命名为琥珀酸-Q 氧化还原酶(succinate-ubiquinone oxidoreductase),也称为琥珀酸脱氢酶复合物(参与柠檬酸循环反应)。据从猪心线粒体复合物Ⅱ研究报道,复合物Ⅱ由延伸到基质的两个亲水亚基(一个结合 FAD,另一个含有 Fe-S 簇)和两个跨膜亚基组成。复合物Ⅱ接收来自琥珀酸的电子,也像复合物Ⅰ那样催化 Q 还原为 QH_2 反应。总反应为:



$$FADH_2 + Q \longrightarrow FAD + QH_2 \quad \Delta E^{\ominus\prime} = 0.085V, \quad \Delta G^{\ominus\prime} = -16.4kJ/mol$$

首先,来自琥珀酸的 2 个电子转移给 FAD,生成 $FADH_2$,然后经 Fe-S 簇传递给 Q,每次传递 1 个电子,生成 QH_2,最后再将电子传递给复合物Ⅲ(图 16.8)。由于电子在复合物Ⅱ中传递释放的自由能为－16.4kJ/mol,释放的能量主要用于将来自琥珀酸氧化的电子引入到电子传递链中,而不是转移质子。

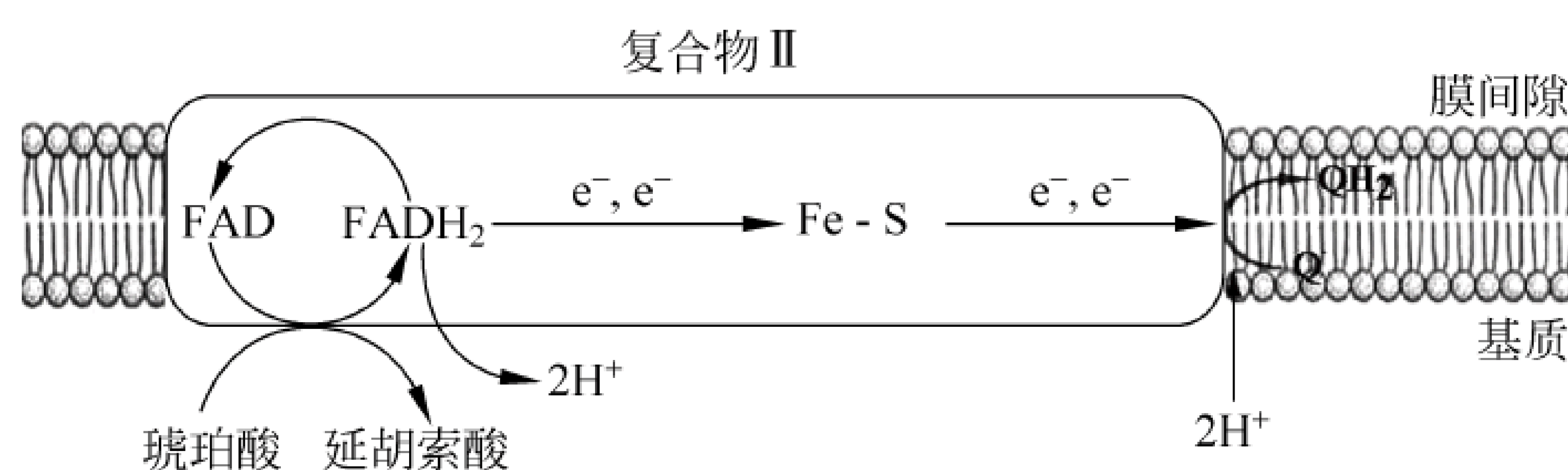


图 16.8 通过复合物Ⅱ的电子传递

16.2.4 复合物Ⅲ

复合物Ⅲ系统命名为泛醌-细胞色素 *c* 氧化还原酶(ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase),也称为细胞色素 bc_1(Cyt bc_1)复合物。牛心脏线粒体复合物Ⅲ是 1 个二聚体,每个单体由 10～11 个多肽链组成,其中包括带有[Fe_2S_2]的铁硫亚基蛋白(Rieske iron-sulfur protein, RISP)、Cyt b_{562}(或称为 Cyt b_H,具有高电位,位于膜间隙附近)、Cyt b_{566}(或称为 Cyt b_L,具有低电位,位于基质附近)和 Cyt c_1。

复合物Ⅲ将电子从 QH_2 传递给可移动的电子载体 Cyt *c*,同时将 4 个 H^+ 转移到膜间隙,其中的 2 个质子来自 QH_2,另 2 个来自基质(图 16.9)。

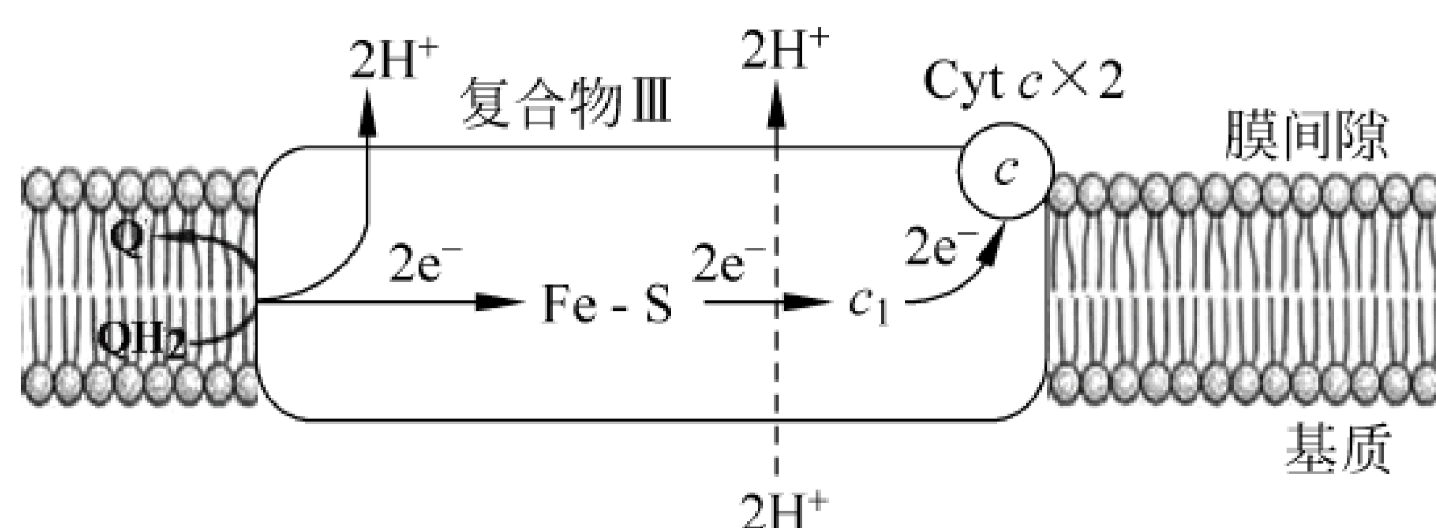


图 16.9　复合物Ⅲ中电子传递和质子转移

图中 c_1 为 Cyt c_1,*c* 为 Cyt *c*

图 16.9 只是电子在复合物Ⅲ传递给 Cyt *c* 和转移 H^+ 的简单过程。后来人们运用 X 射线晶体衍射技术对复合物Ⅲ结构进行测定,根据测定结果和对这些氧化还原反应的研究,提出了一个发生在内膜中称为 Q 循环的电子传递和 H^+ 转移的模型(图 16.10)。

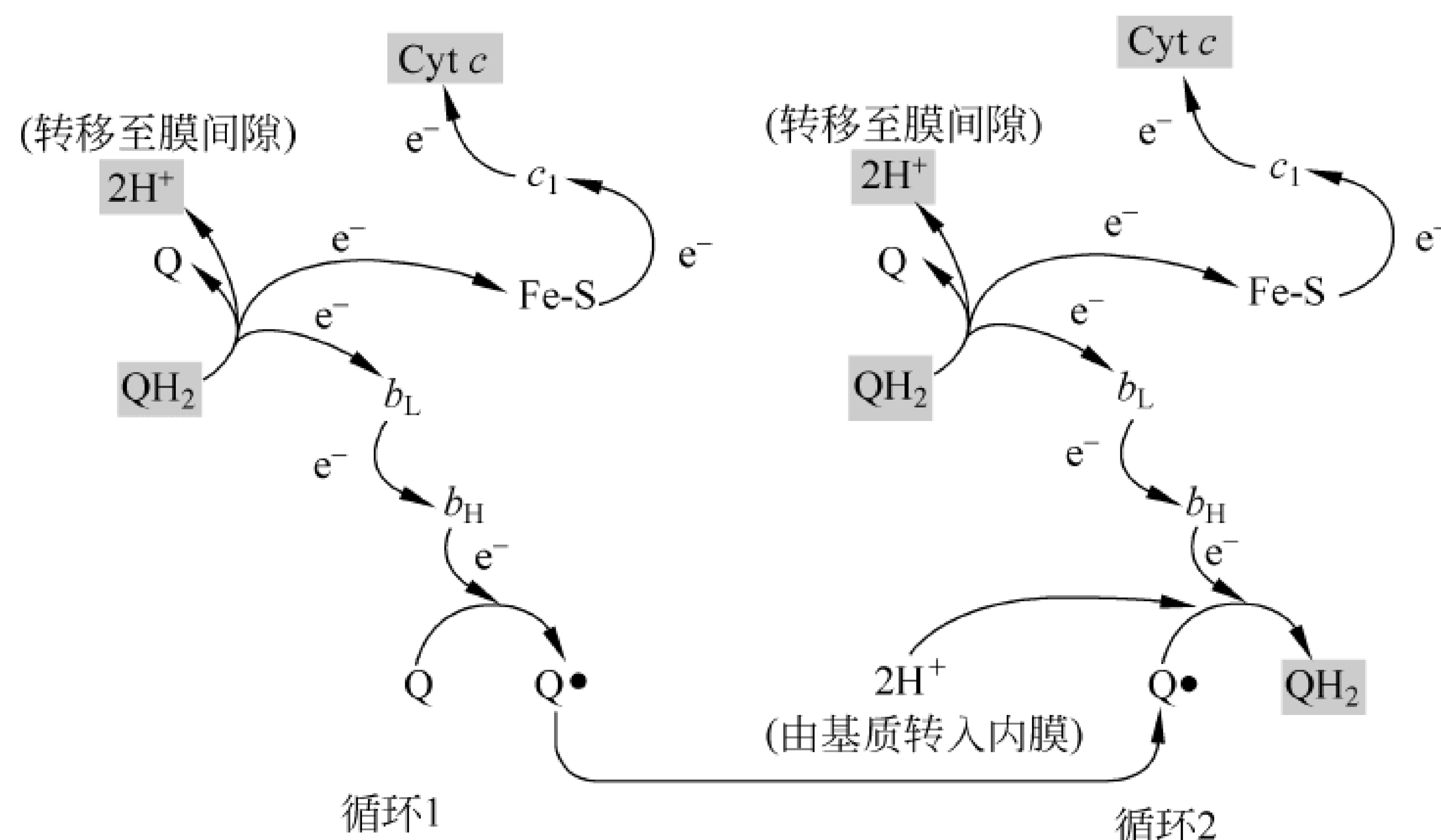


图 16.10　Q 循环

一分子 QH_2 在循环 1 被氧化,另一分子 QH_2 在循环 2 被氧化,每个循环都有一分子还原型 Cyt *c* 生成。两个循环组合使得 Q 还原为 QH_2

从图 16.10 可看出,Q 循环实际上分为两个循环。在循环 1 中,一分子 QH_2 将其中 1 个电子经 Fe-S 和 c_1 传递给 *c*,另 1 个电子经 b_L、b_H 传给 Q,生成 Q·,同时将 2 个 H^+ 转移到膜间隙。在循环 2 中,另一分子 QH_2 分子被氧化,一个电子经 Fe-S 和 c_1 传递给 *c*,同时也有 2 个 H^+ 转移到膜间隙;另一个电子经 b_L、b_H 传给循环 1 生成的 Q·,然后结合来自基质的 $2H^+$ 被还原为 QH_2。

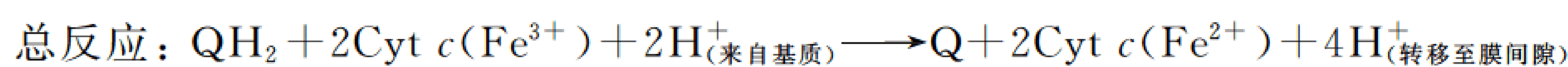
两个循环过后,结果是两分子 QH_2 被氧化,而一分子 Q 被还原重新生成一分子 QH_2,净转移两个电子使两分子 Cyt *c* 还原。所以 Q 循环的净结果就是 1 分子 QH_2 被氧化为 Q 时,有 2 分子 Cyt *c* 被还原,同时有 4 个 H^+ 被转移到了膜间隙。



$$2QH_2 + 2\text{Cyt } c(Fe^{3+}) \longrightarrow 2Q + 2\text{Cyt } c(Fe^{2+}) + 2e^- + 4H^+_{(\text{转移至膜间隙})}$$



$$Q + 2H^+_{(\text{基质})} + 2e^- \longrightarrow QH_2$$



总反应:$QH_2 + 2\text{Cyt } c(Fe^{3+}) + 2H^+_{(\text{来自基质})} \longrightarrow Q + 2\text{Cyt } c(Fe^{2+}) + 4H^+_{(\text{转移至膜间隙})}$

$$\Delta E^{\ominus\prime} = 0.190\text{V},\quad \Delta G^{\ominus\prime} = -36.7\text{kJ/mol}$$

相关话题　细胞色素

复合物Ⅲ中出现的 Cyt b_L、b_H、c_1 和 c，以及复合物Ⅳ中遇到的 Cyt a 和 a_3 都是氧化还原蛋白，在电子传递中由于接收和给出电子会发生 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 氧化态之间转换。细胞色素广泛分布于除少数厌氧生物外的所有生物中，都含有辅基血红素，但取代基稍有不同(图16.11)。

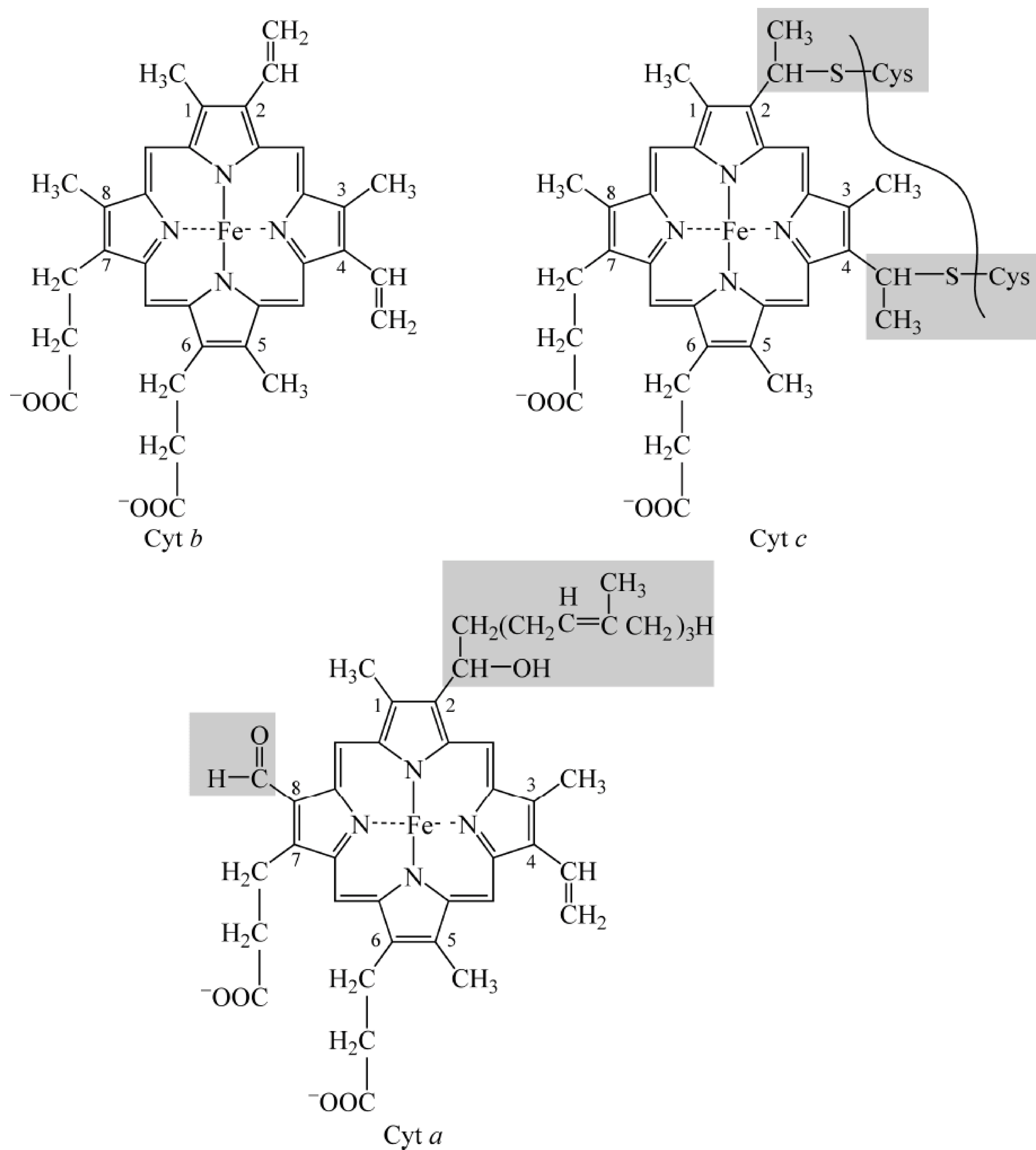


图16.11　Cyt b、Cyt c 和 Cyt a 的血红素结构

Cyt b 的血红素与血红蛋白和肌红蛋白的血红素相同，在原卟啉Ⅸ的 C-2 为一乙烯基，C-8 为甲基；而 Cyt a 的 C-2 连有一个由异戊二烯单位组成的碳氢链，C-8 为甲酰基；Cyt c 的血红素通过乙烯基与两个半胱氨酸残基的巯基形成的二硫醚键与脱辅蛋白共价连接。另外，Cyt a 和 Cyt b 的轴向配基都是组氨酸残基的咪唑基上的 N 原子，而 Cyt c 的配基一个

是组氨酸残基的 N 原子，另一个为蛋氨酸残基的 S 原子。

图 16.12 给出了还原型 Cyt *c* 的吸收光谱。还原型细胞色素的吸收光谱都显示出 α、β 和 γ 3 个吸收峰，细胞色素中血红素辅基的环境不同，α 峰位置也略有不同，据此可以鉴别不同的细胞色素。要注意的是氧化型细胞色素吸收光谱中没有 α 峰。

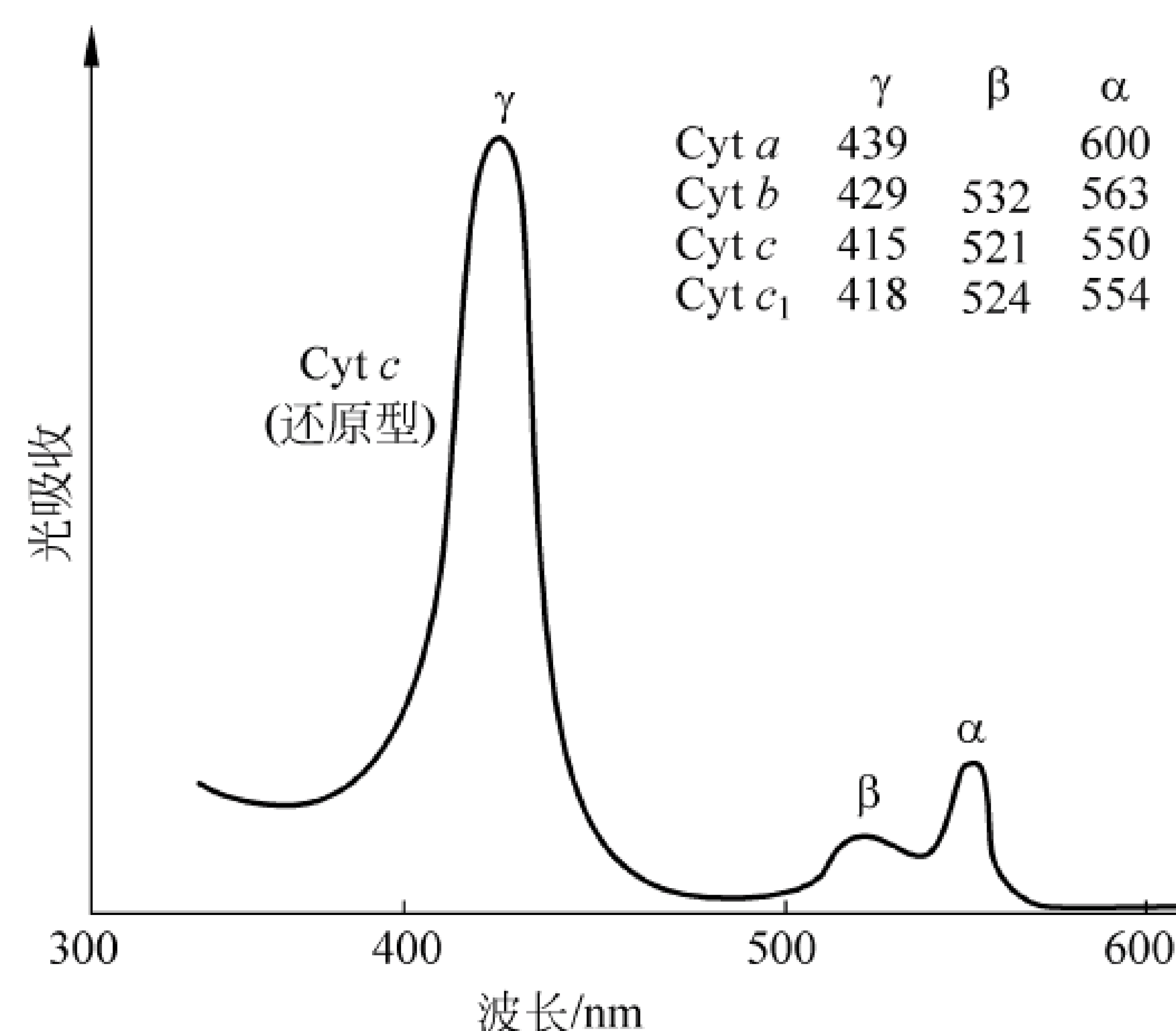
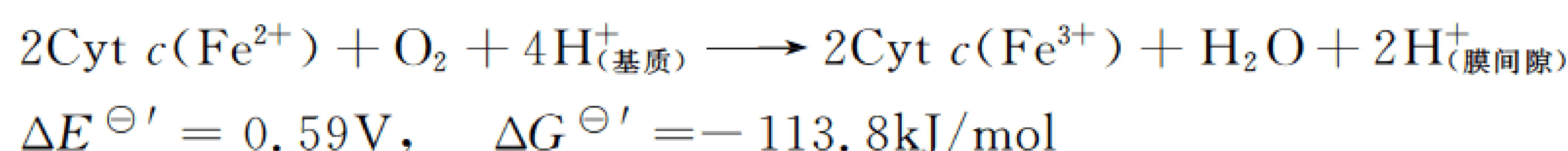


图 16.12　还原型 Cyt *c* 的吸收光谱

图给出了几种细胞色素的 α、β 和 γ 3 个吸收峰的波长

16.2.5　复合物Ⅳ

复合物Ⅳ系统命名为细胞色素 *c* 氧化酶（cytochrome *c* oxidase），催化来自复合物Ⅲ生成的还原型 Cyt *c*(Fe^{2+})的氧化。反应中 2 个电子将$\frac{1}{2}O_2$ 还原为 H_2O，同时有 2 个质子被跨膜转运到膜间隙（图 16.13），总反应为：



$$2\text{Cyt } c(Fe^{2+}) + O_2 + 4H^+_{(基质)} \longrightarrow 2\text{Cyt } c(Fe^{3+}) + H_2O + 2H^+_{(膜间隙)}$$

$$\Delta E^{\ominus\prime} = 0.59\text{V},\quad \Delta G^{\ominus\prime} = -113.8\text{kJ/mol}$$

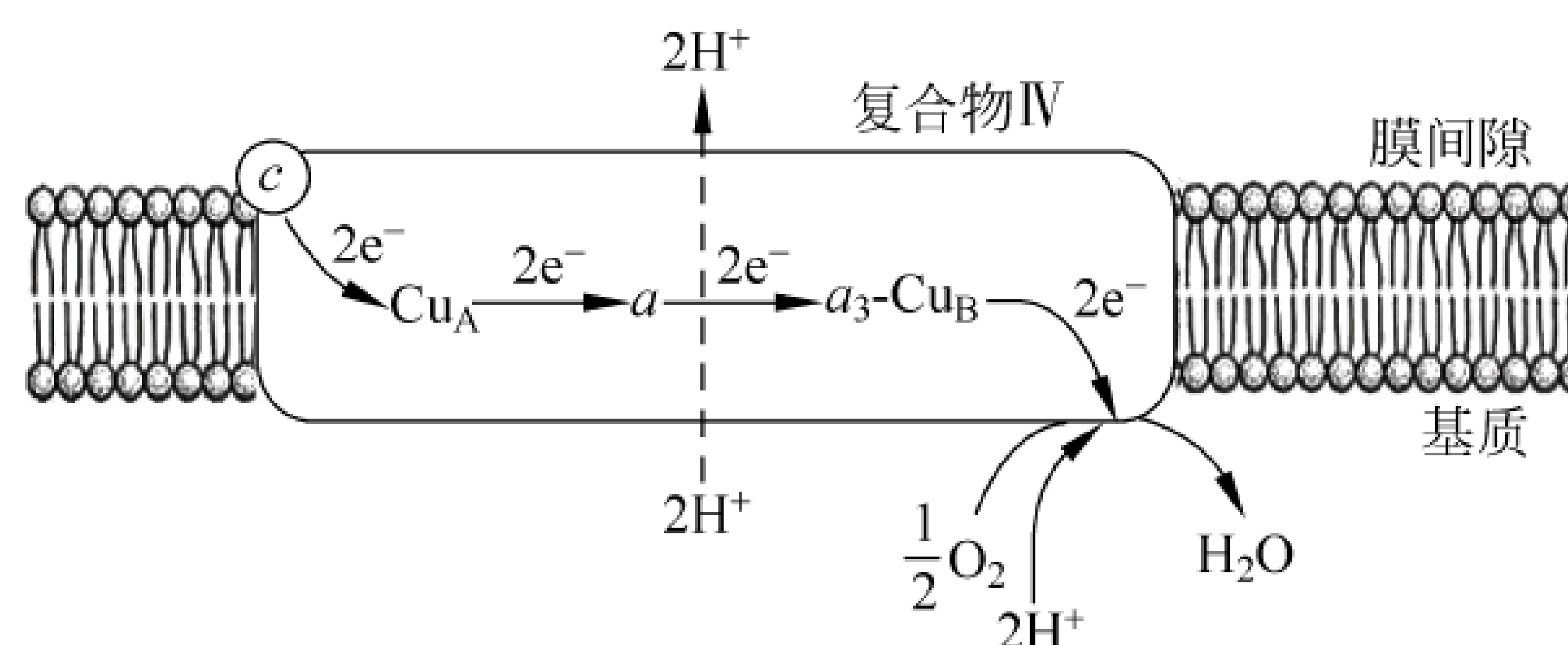


图 16.13　复合物Ⅳ中电子传递和质子转移

a、a_3 分别代表 Cyt *a* 和 Cyt a_3，a_3-Cu_B 为双核中心

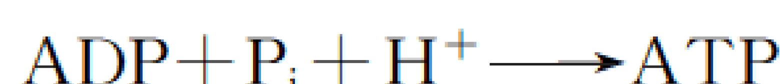
哺乳动物中的复合物Ⅳ是个二聚体，含有 13 条多肽链，总的相对分子质量约为 400 000。复合物Ⅳ中含有称为 Cu_A 中心的 1 对铜原子，Cyt *a*、Cyt a_3 以及与 a_3 相邻的 Cu_B 原子 4 个氧化还原中心。铜原子参与电子传递时，铜离子变换于 Cu^{2+} 和 Cu^+ 离子状态之间。

电子从还原型 Cyt *c* 传递给 Cu_A 中心，然后 Cyt *a* 中的 Fe^{3+} 被还原型 Cu_A 还原为 Fe^{2+}，Fe^{2+} 再将电子传递给 a_3-Cu_B，还原型双核中心 a_3-Cu_B 将位于活性中心的 O_2 还原。

Fe^{2+}、Cu_B^+ 双核中心结合有毒的配体，例如氰化物和一氧化碳，电子传递将被阻断。

16.3 ATP 合成

复合物Ⅴ为 ATP 合酶(ATP synthase)，它在由电子传递过程中产生的质子梯度驱动的反应中催化由 ADP 和 P_i 合成 ATP 的反应。



$$ADP + P_i + H^+ \longrightarrow ATP$$

ATP 合酶是个特殊的 F 型 ATP 酶，称为 F_0F_1 ATP 酶(F_0F_1ATPase)，是按照逆反应命名的酶。但 F 型 ATP 酶负责合成 ATP，而不是水解 ATP。F_0F_1 ATP 酶是个镶嵌在膜中的多亚基跨膜蛋白，主要由 F_1 和 F_0 两个部分组成。整个酶空间结构像个球-柄，F_1 就是球头，而与 F_1 相连的 F_0 就是嵌在内膜中的柄(图 16.14)。

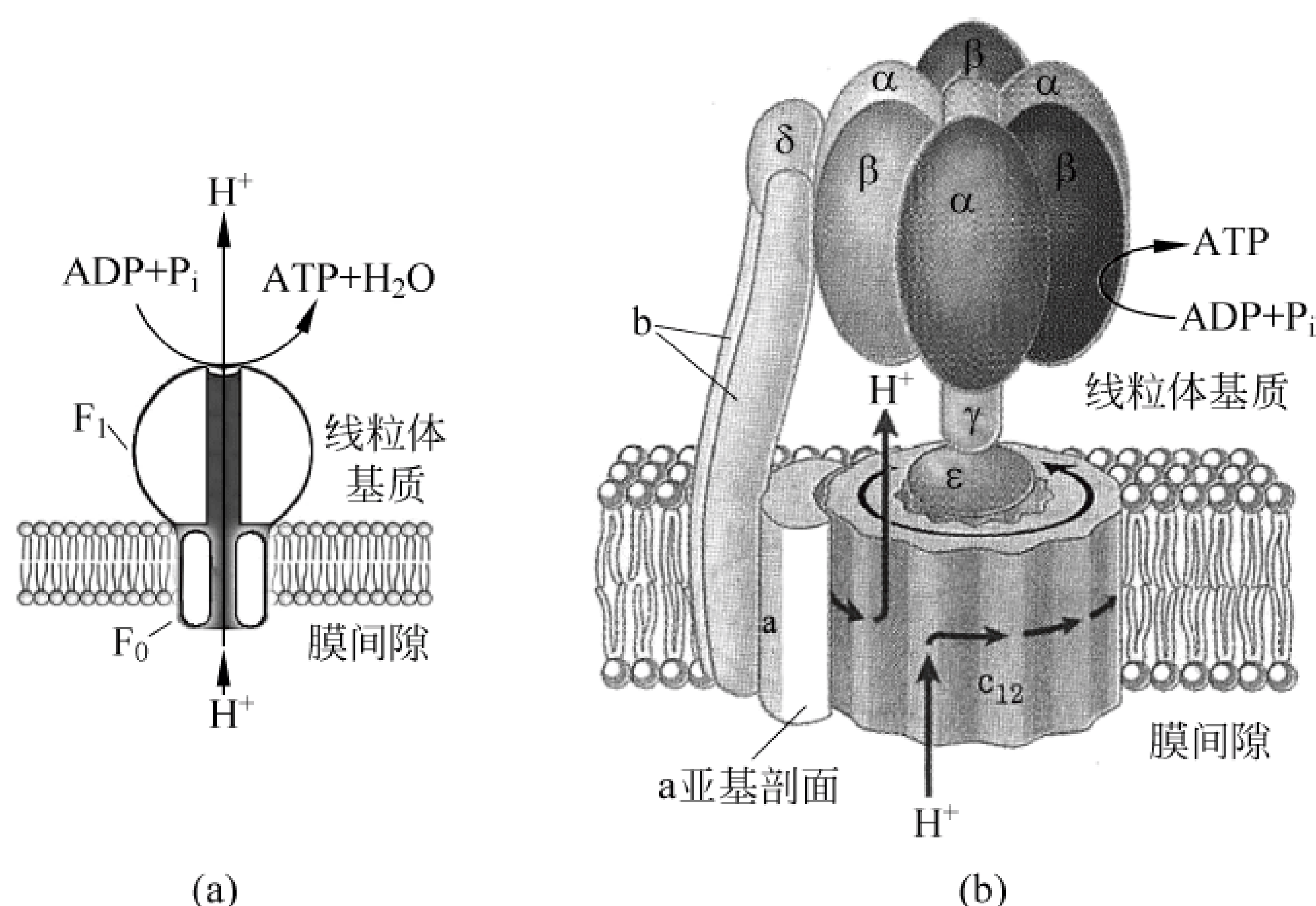


图 16.14 ATP 合酶结构

(a)ATP 合酶球-柄结构简单示意图；(b)根据生物化学和晶体衍射研究结果推导出的 ATP 合酶结构模型。图中将 a 亚基做了 1 个剖面，为的是能够更清楚看到 H^+ 从 a 亚基和 c 亚基交界面进入 F_0，通过每 1 个 c 亚基，并从 F_0 出去的路线

图 16.14(b)给出了根据生物化学和晶体衍射研究结果推导出的 *E. coli* ATP 合酶的 F_1F_0 结构模型。F_1 由 α、β、γ、δ 和 ε 5 种类型的 9 个亚基组成：$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$。α 和 β 亚基像橘子瓣那样围绕类似中心轴一样的 γ 亚基交替排列，组成球状头部，β 亚基催化 ATP 合成反应。但当 F_1 与 F_0 解离后，可溶性的 F_1 不再具有合成 ATP 的活性，而具有水解 ATP 的活性(称为 ATP 酶)。F_0 是由 a、b 和 c 3 种类型 15 个亚基组成：1a：2b：12c。12 个 c 亚基组成的圆柱结构镶嵌在膜中，F_1 的 ε 和 γ 亚基形成的轴穿过圆柱。α 亚基含有跨膜转运的质子通道。2 个 b 亚基与 δ 亚基协同作用将 α 和 β 亚基固定。

H^+ 通过 ATP 合酶进入线粒体基质又是如何驱动 ATP 合成的呢？1979 年 Paul Boyer 提出了一种结合-变构机制(binding-change mechanism)。首先膜间隙中的 H^+ 流从 a 和 c 亚基的交界面进入，并与 a 亚基结合后被排入 c 亚基环，结果 H^+ 流驱动 c 亚基环旋转，同时

引起 γ 轴反方向旋转。γ 亚基像个凸轮轴(或称为偏心轴)一样,约每旋转 120°,就与 $\alpha_3\beta_3$ 球体中的 1 个催化亚基 β 接触,每次接触都会使 β 构象发生变化。

根据结合-变构机制,ATP 合酶 $\alpha_3\beta_3$ 中的 3β 亚基虽然组成一样,但在任一给定时间,由于 γ 与 $\alpha_3\beta_3$ 球体接触部分具有高度不对称性,γ 亚基的不同部分会分别与不同的亚基相互作用,使每个 β 亚基具有不同的构象,不是处于开放(open,O)构象,就是处于松弛(loose,L)或紧密(tight,T)构象。所以 γ 亚基每旋转一周,每个 β 亚基都要经历上述 3 种构象变化(图 16.15)。3 个构象功能各不相同,开放构象对 ATP 亲和力最低,释放 ATP 和准备结合 ADP 和 P_i;松弛构象结合 ADP 和 P_i;紧密构象催化 ADP 和 P_i 合成 ATP。

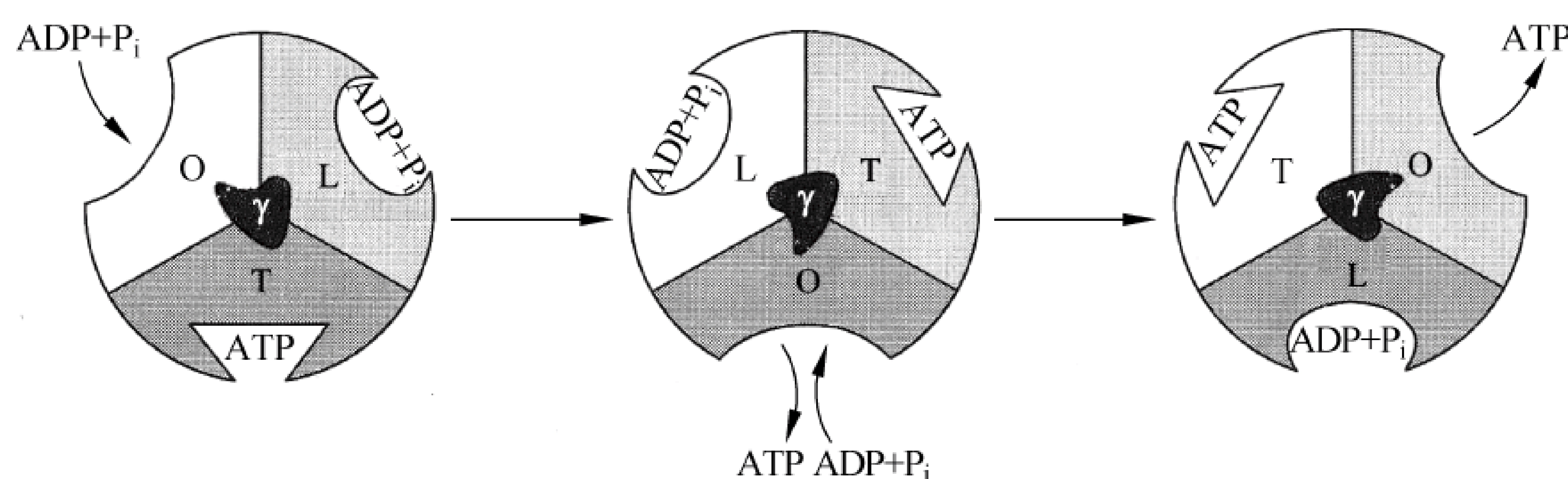


图 16.15　ATP 形成的结合-变构机制

深浅不同的 3 种背景代表 3 个不同的 β 亚基,γ 顶部像 1 个具有 3 个不同形状的凸轮轴,γ 旋转一周,每个 β 与 γ 的 3 个形状都要接触,从而呈现 O、L 或 T 构象

由转移的质子数可以计算出通过复合物Ⅰ～Ⅳ传递的一对电子所产生的 ATP。来自 NADH 的一对电子通过复合物Ⅰ传递转移 4 个 H^+,经复合物Ⅲ转移 4 个 H^+,经复合物Ⅳ又可转移 2 个 H^+,所以传递一对电子可将 10 个 H^+ 转移到膜间隙中。来自琥珀酸的 1 对电子传递导致 6 个 H^+ 被转移到膜间隙。经实验测定,1 个 ATP 合成约需要 4 个 H^+ 经 ATP 合酶进入基质,所以线粒体 NADH 氧化可以产生 2.5 个 ATP,而琥珀酸氧化可以产生 1.5 个 ATP。换言之,每消耗 1 个氧原子可以合成 2.5 个或 1.5 个 ATP。常用 P/O 比代表磷酸化的 ATP 分子数与还原的氧的原子数之比。NADH 氧化的 P/O 为 2.5,而 $FADH_2$ 氧化的 P/O 为 1.5。

结合-变构机制已经被许多实验证实,其中包括 γ 相对于 αβ 的旋转,以及 F_0 的 c 环旋转实验(图 16.16)。

M. Yoshida 等设计了 1 个直接观察 γ 旋转的实验[图 16.16(a)]。他们制备了 ATP 合酶的 $\alpha_3\beta_3\gamma$,并在每个 β 的 N 端连接了 1 个由一串组氨酸构成的组氨酸尾巴。利用组氨酸侧链对包被了 Ni-NTA 的盖玻片的高亲和性,将 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 的头部固定在盖玻片上。然后将一条短的带有荧光标记的肌动蛋白纤维连接在 γ 亚基的末端。当将上述制备的样品与 ATP 一起温育时,在显微镜下观察可看到肌动蛋白纤维在旋转,推动旋转的能量来自 β 亚基催化 ATP 水解释放的能量。

利用证明 γ 旋转的类似方法,也可以直接观察到 F_0 的 c 旋转[图 16.16(b)]。首先将制备的完整的 ATP 合酶(F_0F_1)固定在盖玻片上,然后再将肌动蛋白纤维与 c 亚基环连接,与 ATP 一起温育时,在显微镜下也可观察到连接在 c 环上的肌动蛋白纤维在旋转。

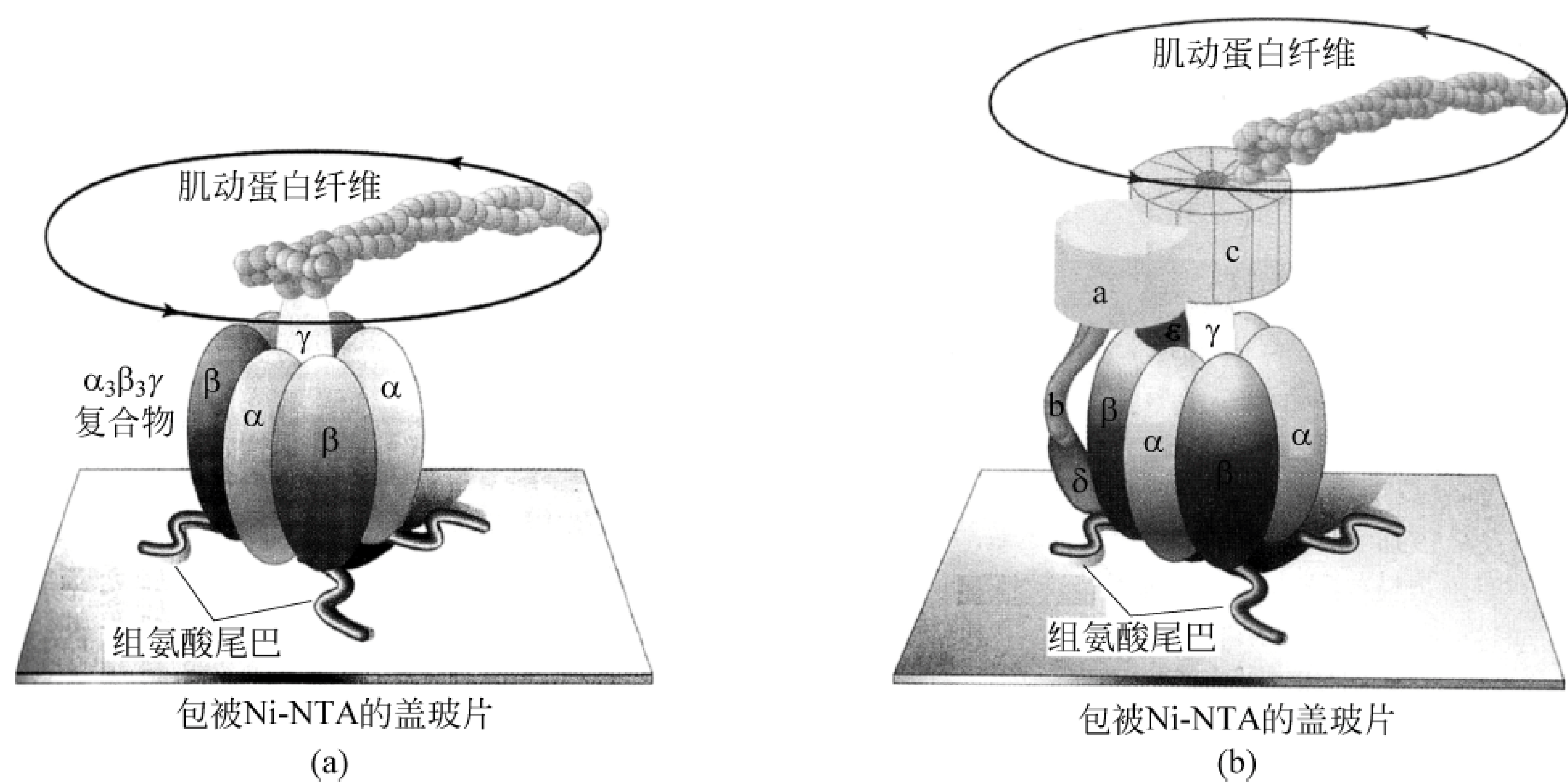


图 16.16　γ亚基旋转和c旋转实验

(a) F_1 的γ旋转的直接观察实验；(b)F_0 的c旋转的直接观察实验

(来源：Noji H，Yasuda，R，Yoshida M，Kinosita，Jr，1997)

相关话题　生存的高消费

一个健康成年人每天约需要10 080kJ(2400kcal)。如果所有这些能量都换算成ATP当量，那么每天将有210mol ATP水解(假定ATP水解的Gibbs自由能为48kJ/mol)，这约等于100kg ATP(M_r=507)。

当然所有这些ATP都应当在体内合成，而且最主要的途径是由线粒体质子梯度驱动的ATP合成。实际计算和测量值表明平均一个人每秒制造9×10^{20}个分子ATP或每天制造78×10^{24}个分子ATP，即130mol或66kg ATP。

因此，为了驱动ATP合成，我们摄入的大部分热量都转换成了质子梯度。这些计算也告诉我们ATP分子转换特别快，因为我们身体不可能携带66kg ATP。

引自：RICH P. Nature[J]. 2003：421，583.

16.4　胞液NADH进入线粒体机制

以上讨论的都是存在于线粒体内的NADH等辅酶的氧化磷酸化过程，要使胞液中糖酵解生成的NADH进行有氧氧化，首先需要将它转运到线粒体内。在真核生物中存在着两种主要穿梭转运途径：甘油磷酸穿梭和苹果酸-天冬氨酸穿梭途径，胞液中的还原型辅酶通过这两个途径将它们的还原力传给一个线粒体内可变成电子传递链中底物的分子，进行有氧氧化。

16.4.1 甘油磷酸穿梭途径

昆虫飞行肌中的穿梭系统主要是甘油磷酸穿梭(glycerol phosphate shuttle)途径,靠这一途径维持着极高的 ATP 合成速度。大多数的哺乳动物细胞中也存在该穿梭途径,但所占比重较小。

甘油磷酸穿梭途径涉及 2 个酶:一个是胞液中依赖于 NAD^+ 的甘油-3-磷酸脱氢酶,另一个是嵌线粒体内膜的甘油-3-磷酸脱氢酶复合物,该复合物含有 1 个 FAD 辅基和 1 个位于线粒体内膜外表面上的底物结合部位。首先在胞液甘油-3-磷酸脱氢酶催化下,NADH 使磷酸二羟丙酮还原生成甘油-3-磷酸,然后经被嵌膜的甘油-3-磷酸脱氢酶复合物催化转换回磷酸二羟丙酮(图 16.17)。在转换过程中 2 个电子被转移到嵌膜酶的 FAD 辅基上生成 $FADH_2$。$FADH_2$ 将 2 个电子转给可移动的电子载体 Q,然后再转给 Q-Cyt *c* 氧化还原酶(复合物Ⅲ),进入电子传递链。

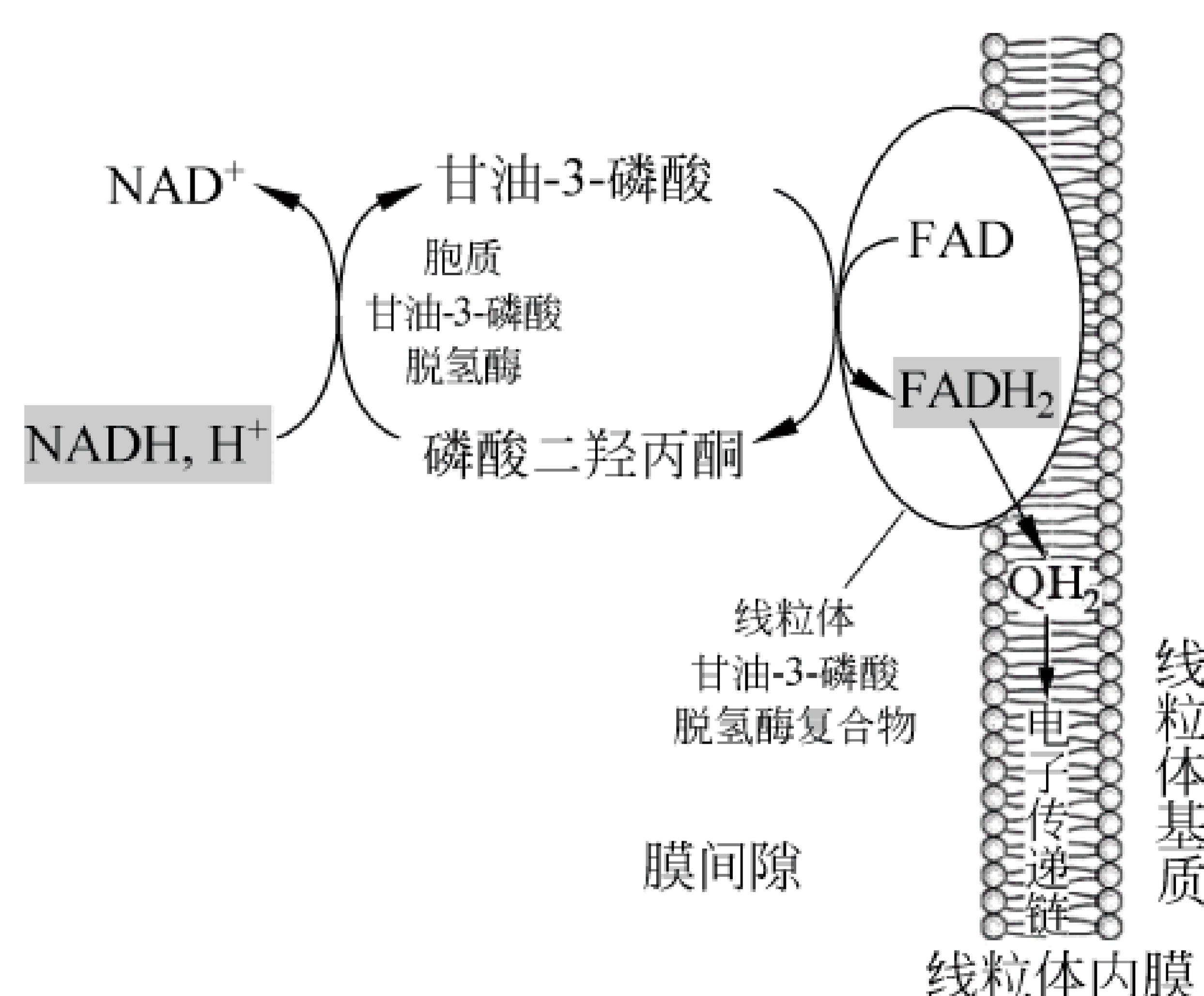


图 16.17 甘油磷酸穿梭途径

从总体来看,甘油磷酸穿梭途径使胞液中的 NADH 氧化,并在线粒体内膜中生成 QH_2。胞液中的 NADH 通过这一途径转换成 QH_2 后氧化所产生的能量(1.5 个 ATP)比线粒体内 NADH 氧化的能量(2.5 个 ATP)少。

16.4.2 苹果酸-天冬氨酸穿梭途径

在哺乳动物的肝脏和其他一些组织中,存在着最活跃的苹果酸-天冬氨酸穿梭(malate-aspartate shuttle)途径(图 16.18)。这一穿梭途径涉及胞液和线粒体基质中的苹果酸脱氢酶和天冬氨酸转氨酶,以及线粒体内膜中的移位酶(translocase)。

首先在胞液中的苹果酸脱氢酶催化下,胞液 NADH 使草酰乙酸还原为苹果酸,然后,苹果酸经二羧酸移位酶(dicarboxylate translocase)作用,在与 α-酮戊二酸交换过程中进入线粒体基质。在基质中,线粒体苹果酸脱氢酶催化苹果酸重新氧化为草酰乙酸,同时使线粒体内的 NAD^+ 还原为 NADH,然后 NADH 被呼吸电子传递链的复合物Ⅰ氧化。

穿梭的连续进行需要将草酰乙酸转运回胞液中,但转运不是直接进行的,因为草酰乙酸不能直接穿越线粒体内膜被转运回胞液中。所以在基质中,在线粒体天冬氨酸转氨酶的催化下,草酰乙酸先与谷氨酸反应生成 α-酮戊二酸和天冬氨酸,α-酮戊二酸经二羧酸移位酶作用在与进入线粒体的苹果酸交换中被排出线粒体。天冬氨酸经谷氨酸-天冬氨酸移位酶(glutamate-aspartate translocase)催化在与进入线粒体的谷氨酸交换中被排出线粒体。

在胞液中,天冬氨酸和 α-酮戊二酸作为胞液中天冬氨酸转氨酶的底物生成谷氨酸和草酰乙酸,谷氨酸在与天冬氨酸的交换中重新进入线粒体,而草酰乙酸与胞液中的另 1 分子 NADH 反应,重复上述循环。由于胞液中的 NADH 经苹果酸-天冬氨酸穿梭途径转换为线粒体中的 NADH,再经电子传递和氧化磷酸化过程,所以胞液中的 1 分子 NADH 可以生成 2.5 个 ATP。

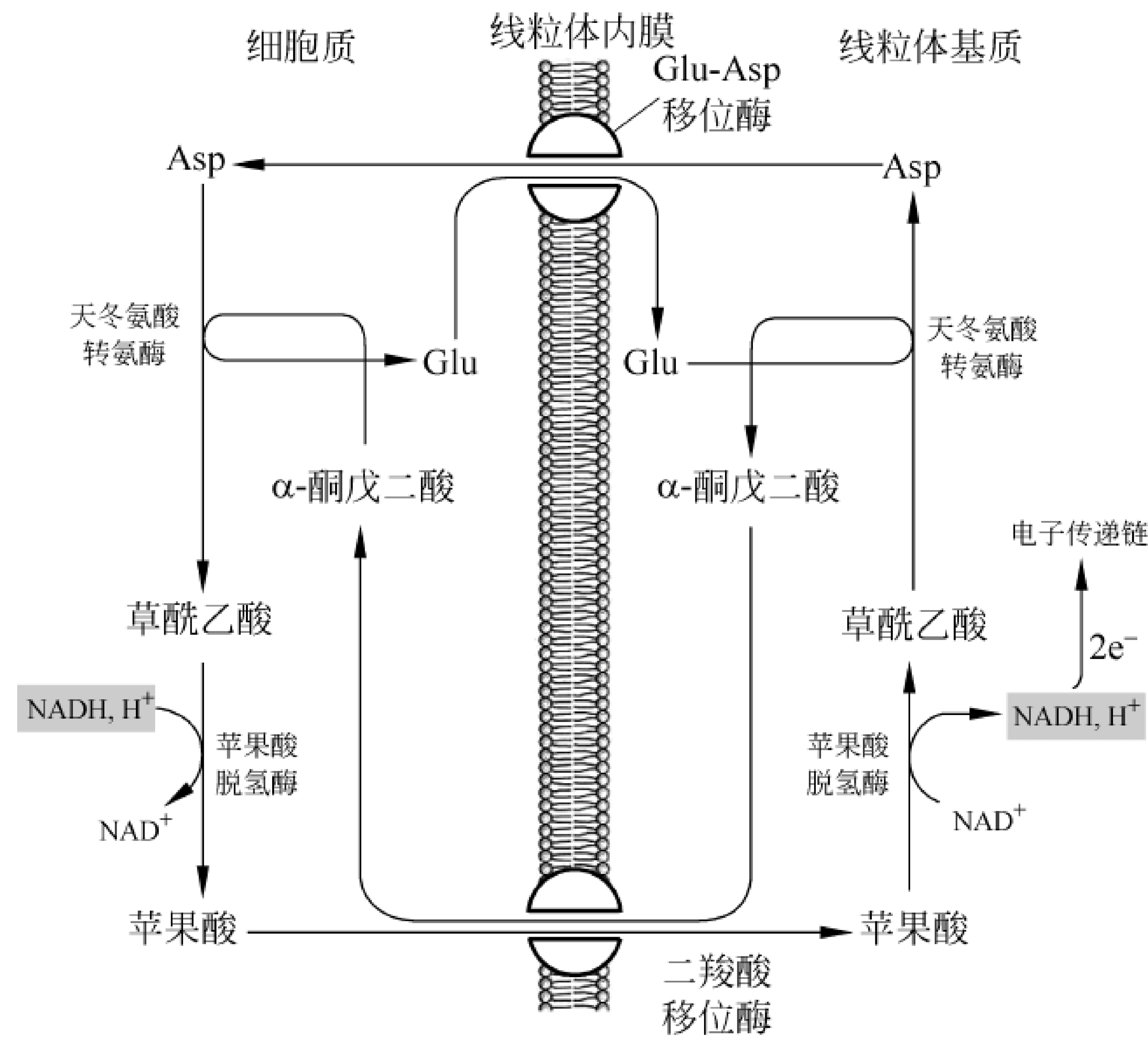
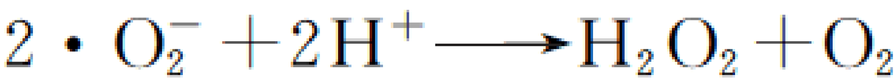


图 16.18　苹果酸-天冬氨酸穿梭途径

16.5　活性氧

有氧代谢确实能够从像葡萄糖那样的有限燃料代谢中获得更多的能量,然而,氧代谢的一个不幸结果是伴随着有氧代谢还会产生少量的活性氧(reactive oxygen species, ROS):超氧自由基($\cdot O_2^-$)、羟基自由基($OH\cdot$)和过氧化氢(H_2O_2)。这些活性氧主要是由电子载体黄素蛋白、泛醌和铁-硫蛋白产生的,可以说几乎所有的电子传递反应都会产生少量的活性氧,特别是$\cdot O_2^-$。如果这些超氧阴离子不能迅速清除掉就会损伤细胞成分,例如引起蛋白质氧化、脂质过氧化、DNA 的碱基修饰及链断裂。几种退行性疾病,例如帕金森(Parkinson)、阿尔茨海默(Alzheimer)和亨廷顿(Huntington)疾病都与线粒体的氧化损伤有关。另外,据报道正常代谢中产生的自由基引起的反应也与人的衰老有关。

毋庸置疑,在过去20亿年生存的生物已适应了有氧生存的环境,能够利用来自有氧代谢的能量,也能将氧气本身带来的潜在危害降至最低,因为所有需氧生物都含有清除活性氧的酶。首先在超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)催化下,两个超氧阴离子转化为过氧化氢和 O_2,反应进行的极快。



$$2\cdot O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

然后,形成的过氧化氢可在过氧化氢酶催化下转换为 H_2O 水和 O_2。



$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

小结

1. 线粒体由双层膜围绕,电子传递复合物和 ATP 合酶嵌在内膜中,内膜高度折叠。
2. 通过膜结合的电子传递系统与 ATP 合成偶联,还原型辅酶中的能量以 ATP 形式

再现。

3. 化学渗透理论解释了质子梯度的能量是怎样被用于合成 ATP 的。

4. 电子传递复合物Ⅰ～Ⅳ含有多个多肽和辅助因子。电子载体以还原电位依次增加的次序紧密排列。可移动载体泛醌(Q)和细胞色素 *c* 将复合物中的氧化-还原反应串联起来。

5. 一对电子由 NADH 经复合物Ⅰ转移至 Q 贡献给质子浓度梯度 4 个质子。

6. 复合物Ⅱ对质子浓度梯度没有直接贡献，而是将来自琥珀酸氧化的电子提供给了电子传递链。

7. 一对电子通过复合物Ⅲ由 QH_2 向细胞色素 *c* 的转移与 4 个质子通过 Q 循环转移到膜间隙的过程偶联。

8. 通过复合物Ⅳ，一对电子由细胞色素 *c* 转移给 $\frac{1}{2}O_2$，生成 H_2O，并将 2 个质子转移到膜间隙。

9. 质子经由复合物Ⅴ(ATP 合酶)跨膜返回到线粒体基质。通过分子泵的运作产生构象变化，质子流驱动由 ADP 和 P_i 合成 ATP。

10. 通过复合物Ⅰ～Ⅳ转移每一对电子产生的 ATP 定义为 P/O 比，该比率取决于转移的质子数。线粒体中 NADH 的氧化产生 2.5ATP，而琥珀酸氧化产生 1.5ATP。

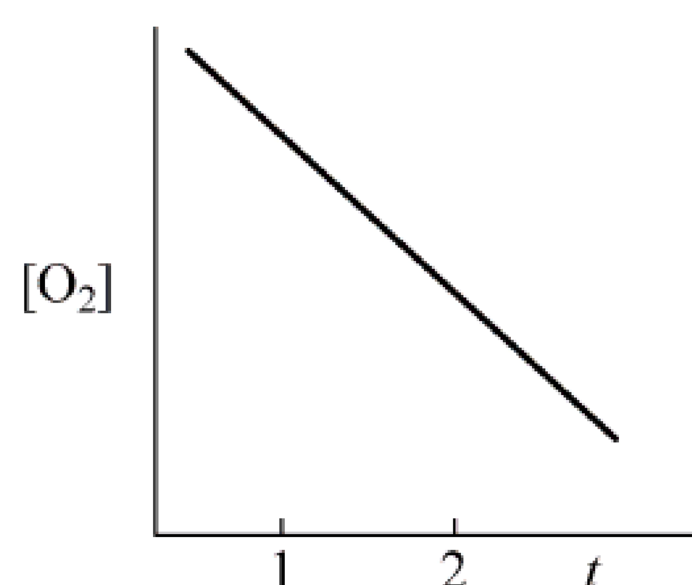
11. 胞液中的 NADH 可通过甘油磷酸或苹果酸穿梭途径可转换为线粒体的 QH_2 或 NADH，通过电子传递链进行氧化磷酸化。

12. 超氧化物歧化酶可将超氧化物自由基转换过氧化氢，过氧化氢再通过过氧化氢酶除去。

习题

1. 超声处理产生的线粒体内膜碎片，内面朝外重新闭合形成称为亚线粒体颗粒的球状膜泡。这些颗粒能够在 NADH 或 $FADH_2$ 这样的电子源存在时合成 ATP。画图显示在这些颗粒中从 NADH 开始的电子传递、质子转移和磷酸化过程。假定氧化磷酸化的底物过量存在，当悬浮亚线粒体颗粒的悬浮液 pH 上升时，ATP 合成是增加还是减少？

2. 含有过量 ADP 和 P_i 的线粒体悬浮液的耗 O_2 曲线如下图所示(纵坐标为氧浓度，横坐标为时间)。



画出：(a)当 *t* 为 1 时加入安密妥；(b)当 *t* 为 1 时加入安密妥，*t* 达到 2 时加入琥珀酸；(c)当 *t* 为 1 时加入 CN^-，*t* 达到 2 时加入琥珀酸；(d)当 *t* 为 1 时加入寡霉素，*t* 达到 2 时加入 2,4-二硝基苯酚的各个耗 O_2 曲线。

3. 就下面给出的双电子供体，给出由线粒体基质转移到膜间隙中的质子数、合成的 ATP 数和 P/O 比。假设电子最终传递给 O_2，电子传递和氧化磷酸化系统都具备。

(a) NADH；(b) 琥珀酸；(c) 抗坏血酸(可提供两个电子给细胞色素 *c*)

4. 有效的电子传递系统可以用纯化的电子传递链成员和膜粒子再构成,对于以下各组成员,确定最终的电子受体(假设有氧气存在)。

(a) NADH,Q,复合物Ⅰ、复合物Ⅲ和复合物Ⅳ

(b) NADH,Q,细胞色素 c,复合物Ⅱ和复合物Ⅲ

(c) 琥珀酸,Q,细胞色素 c,复合物Ⅱ、复合物Ⅲ和复合物Ⅳ

(d) 琥珀酸,Q,细胞色素 c,复合物Ⅱ和复合物Ⅲ

5. (a)当线粒体悬浮液中含电子供体和无机磷酸而缺少 ADP 时,耗氧量如何变化?(b)加入 ADP 后又如何?

6. 已证实人体中有一个基因编码解联蛋白-2(UCP-2),UCP-2 存在于许多组织中,是线粒体膜中一种质子转运蛋白。根据 UCP-2 的功能,人们设计了一种减肥药,它可调控这个基因生产的 UCP-2 量。请解释增加 UCP-2 蛋白使人减肥的道理。

7. 分子氧氧化细胞色素 a/a_3 时,每转移 1 摩[尔]电子其标准自由能为-102.3kJ。此过程中能够生成多少 ATP? 实际将会生成多少 ATP? 生成 ATP 的效率为多少(用百分比表示)?

8. 成人平均每天消耗约 7000kJ 的自由能。假设发生在标准条件下,

(a) 需要水解多少摩尔的 ATP 才能提供这么多的自由能?

(b) 这么多摩尔 ATP 的质量是多少?

(c) 如果成人中 ADP 量约为 0.1mol,0.1mol ADP 每天需要循环多少次才能合成那么多的 ATP? (ATP 相对分子质量为 507)

9. 当一分子葡萄糖被完全氧化为 6 分子二氧化碳时,生成的总 ATP(没有扣除投入的 2ATP)中由氧化磷酸化和底物水平磷酸化生成的 ATP 各占百分之多少? 假设所有的 NADH 和 $FADH_2$ 都被氧化以生产 ATP,所有的丙酮酸都被转化成乙酰 CoA,而且使用的是苹果酸—天冬氨酸穿梭途径。

10. 两个生化专业的学生打算用鼠肝中提取的线粒体进行氧化磷酸化实验。根据实验步骤,需要向反应体系中加入纯化的细胞色素 c,其中对细胞色素 c 的来源没有要求。请问为何需要细胞色素 c? 为何细胞色素 c 的来源不必和线粒体的来源相同?

11. 饲喂"自助餐"(食物充裕)的老鼠往往比饮食摄入有限的老鼠死得更快。解释这种现象。

17　光 合 作 用

在前面一些章节我们已经看到，糖通过糖酵解和柠檬酸循环以及氧化磷酸化过程完全氧化为二氧化碳和水，同时可以生成大量的 ATP。糖最终来源于何处？答案是植物的光合作用。绿色植物通过光合作用(photosynthesis)，利用太阳能可将大气中的 CO_2 和水合成为糖，并释放出氧气。光合作用使得地球上的碳构成一个碳循环，即非光养生物通过氧化糖获得能量，并释放出 CO_2，而光养生物捕获 CO_2 并使其还原为糖。

光合作用包括光反应(light reaction)和暗反应(dark reaction)两个阶段(图 17.1)：

光反应：$H_2O + ADP + P_i + NADP^+ \longrightarrow O_2 + ATP + NADPH + H^+$。

暗反应：$CO_2 + ATP + NADPH + H^+ \longrightarrow (CH_2O) + ADP + P_i + NADP^+$。

总反应：$CO_2 + H_2O \longrightarrow (CH_2O) + O_2$。

其中(CH_2O)代表糖。

光反应阶段的特征是在光驱动下水分子氧化释放的电子通过类似于线粒体呼吸电子传递链那样的电子传递系统传递给 $NADP^+$，使它还原为 NADPH。电子传递的另一结果是基质中质子被泵送到类囊体腔内，形成的跨膜质子梯度驱动 ADP 磷酸化生成 ATP。

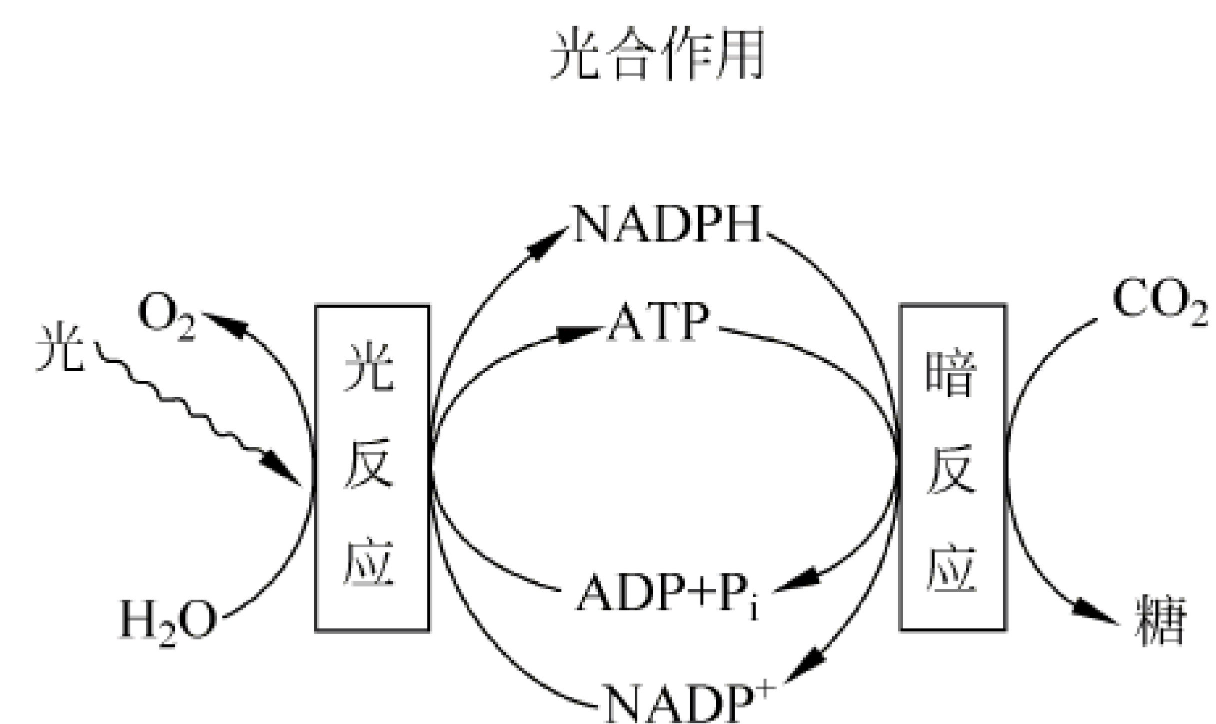
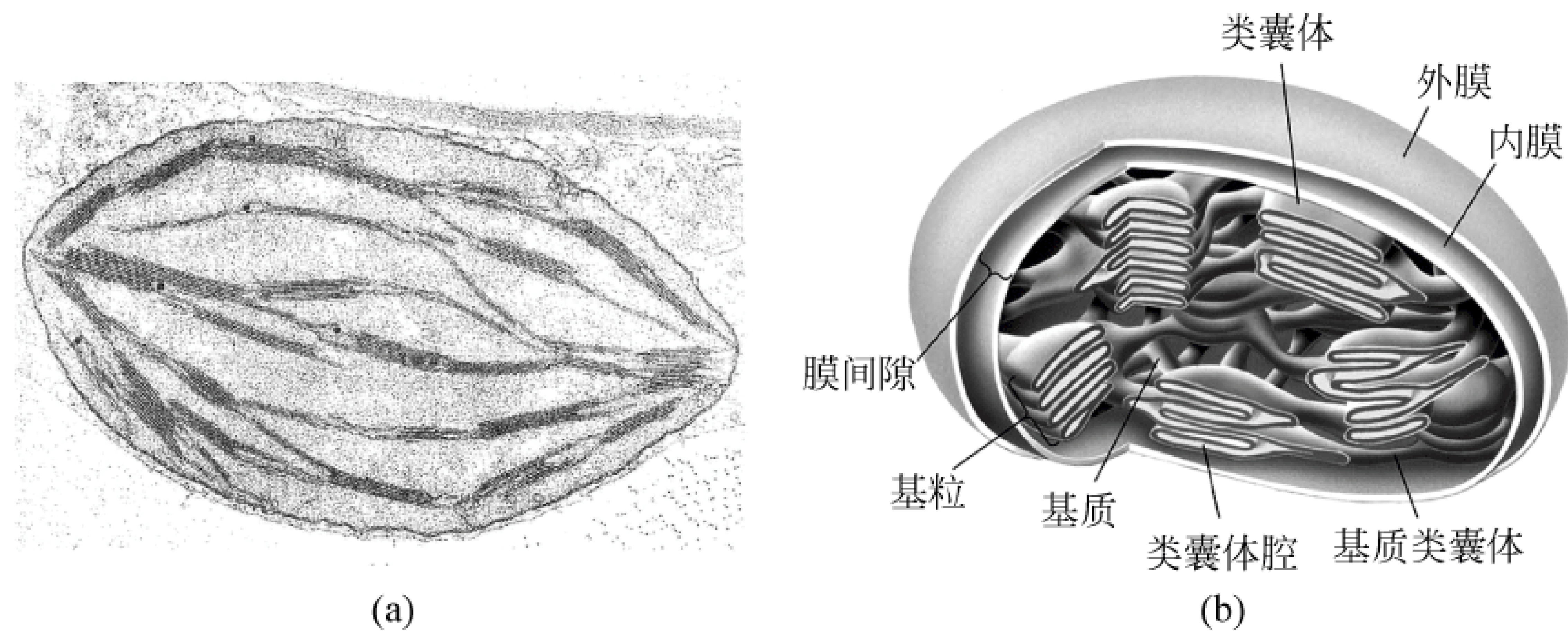


图 17.1　光合作用两个阶段示意图

暗反应阶段是利用光反应生成的 NADPH 和 ATP 进行碳的同化作用，使气体二氧化碳还原为糖。由于这个阶段基本上不直接依赖于光，而只是依赖于 ATP 和 NADPH 的供给，故称为暗反应阶段。

17.1　叶绿体和光合色素

在植物和藻类中，光合作用发生在一个称为叶绿体的特殊细胞器中(图 17.2)。像线粒体那样，叶绿体也是由双层膜包围，有一高通透性的外膜和一层几乎不通透的内膜。两膜之间为一狭窄的膜间隙，内膜包围着基质和悬浮在基质之中由扁平囊组成的复杂膜系统。扁平囊称为类囊体(thylakoids)，类囊体囊内称为类囊体腔。大部分类囊体有序地折叠堆积在一起形成基粒(grana)，基粒中的类囊体称为基粒类囊体。基粒之间由未堆积的类囊体(称为基质类囊体)连接，两种类囊体的腔是彼此联通的。类囊体是光合作用的光反应部位，基质是暗反应部位。另外基质中还含有编码一些叶绿体蛋白的 DNA 以及 RNA 和核糖体。



(a) (b)

图 17.2 叶绿体结构

(a) 菠菜叶绿体电镜照片;(b) 叶绿体结构示意图

存在于类囊体膜中光吸收色素主要是叶绿素(chlorophyll)。在光合自养生物中存在着 4 种类型的叶绿素(图 17.3),其中叶绿素 a(chlorophyll a,Chl a)和叶绿素 b(chlorophyll b,Chl b)是绿色植物中发现的两种类型叶绿素,Chl a 比 Chl b 含量更丰富。光合细菌中的主要色素是细菌叶绿素 a(bacteriochlorophyll a, BChl a)和细菌叶绿素 b(bacteriochlorophyll b, BChl b)。这些色素结构上的主要区别表现在分子中取代基团的不同。

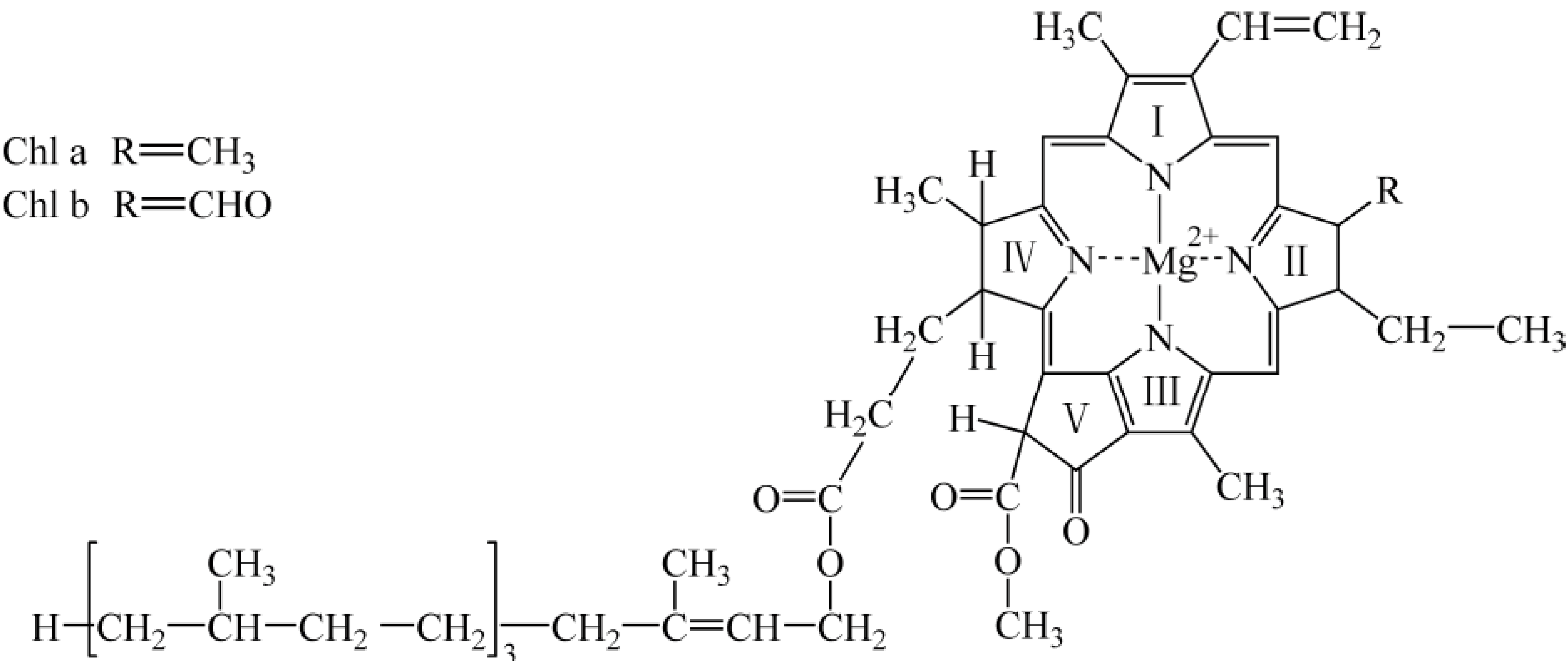


图 17.3 叶绿素 a 和叶绿素 b 的结构

叶绿素分子通过共价和非共价键与内在膜蛋白结合,按特定取向排列于类囊体膜上。所有色素的共同特征是有亲水的卟啉环,含有吸收光的共轭双键网络和疏水的植醇侧链,侧链有助于叶绿素锚定在膜中。叶绿素的卟啉环类似于血红蛋白、肌红蛋白和细胞色素中的血红素辅基卟啉环,但血红素含 Fe^{2+},而叶绿素含 Mg^{2+}。

除了叶绿素之外,类囊体膜上还存在几种辅助色素。其中有存在于所有光养生物的类胡萝卜素(黄色到棕色)和存在于某些藻类和蓝细菌的藻胆色素(phycobilins):藻红蛋白(phycoerythrin)(红色)和藻蓝蛋白(phycocyanin)(蓝色)。这些色素也像叶绿素一样含有一系列的共轭双键,具有吸收光的特性(图 17.4)。

Chl a 和 Chl b 都吸收紫色到蓝色区域(400～500nm)和橙色到红色区域(650～700nm)的光,因 Chl a 和 Chl b 结构稍有差别,所以它们的吸收曲线也略有不同(图 17.5)。辅助色素的吸收最大区域可以补偿叶绿素没有吸收的区域,将光合自养生物吸收的光能范围扩大了,使得光合作用可利用的光能范围涵盖了整个可见光谱区。

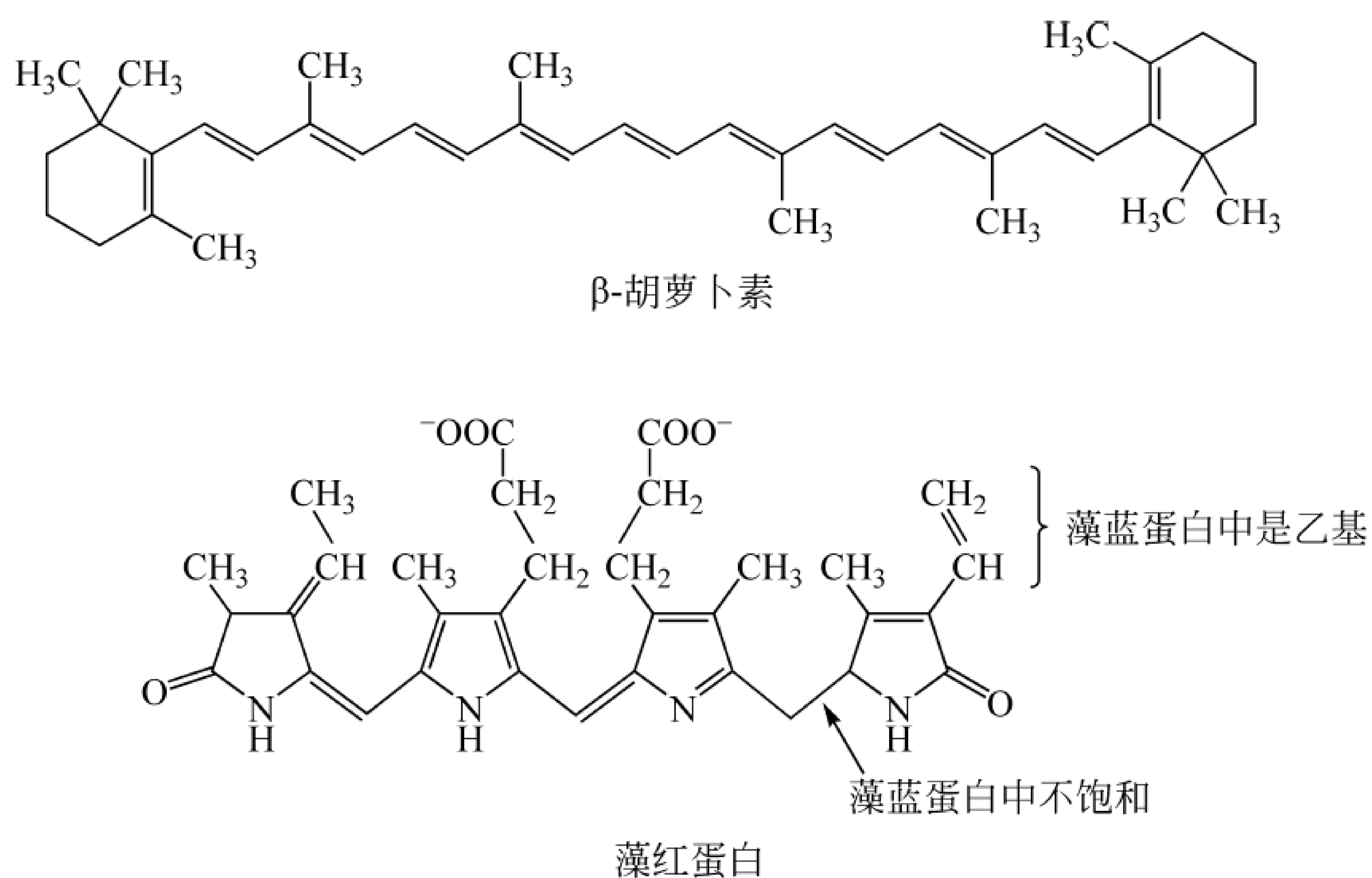


图 17.4 几种辅助色素

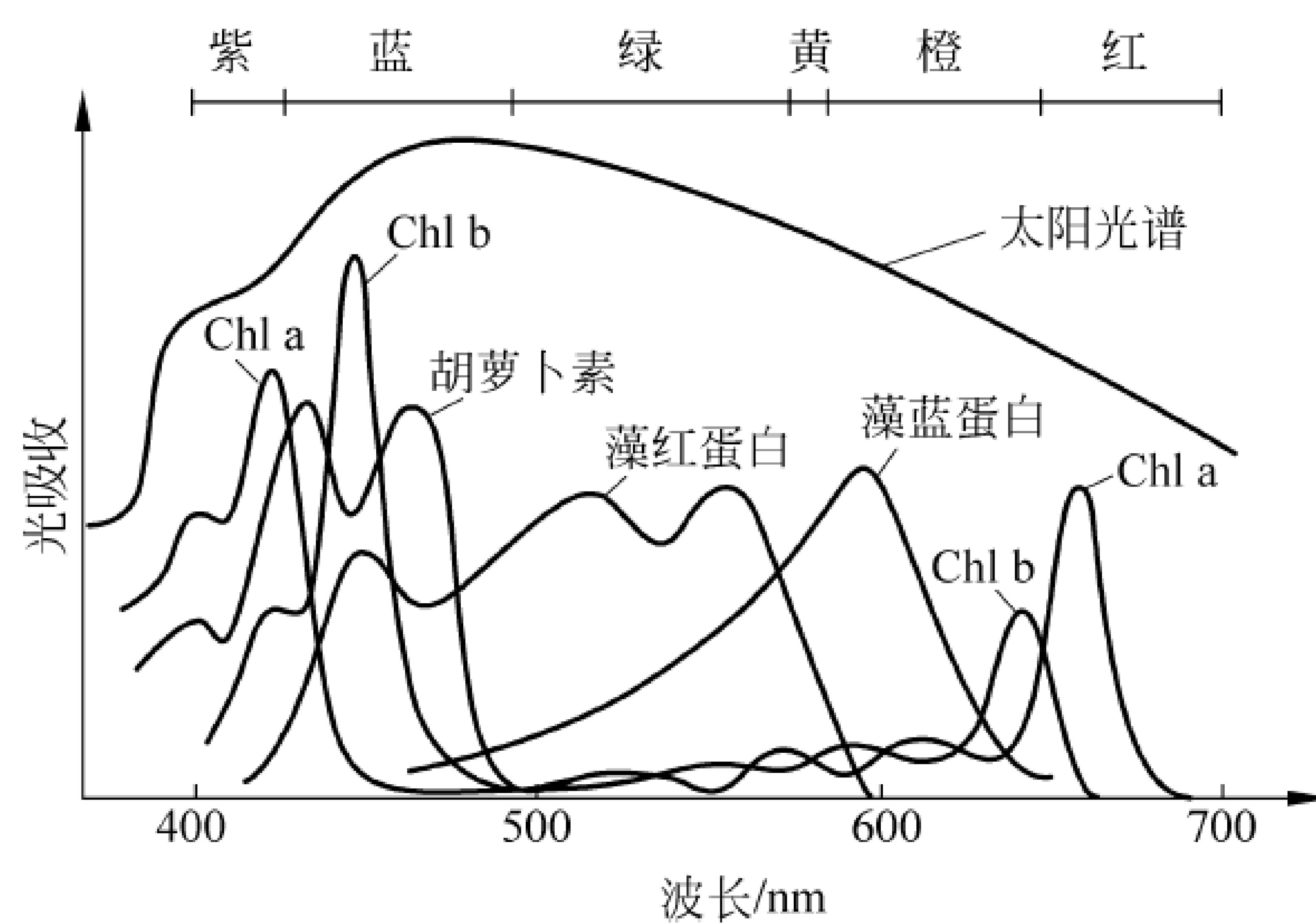


图 17.5 主要光合色素的吸收光谱

许多色素分子被称为天线色素，它们聚集在一起形成集光复合物(light-harvesting complex，LHC)，并不直接参与光化学反应，只是作为集光“天线”收集光能。天线色素将吸收的光子能量从一个分子传给另一分子，一直传给光系统反应中心的叶绿素分子(17.6)。

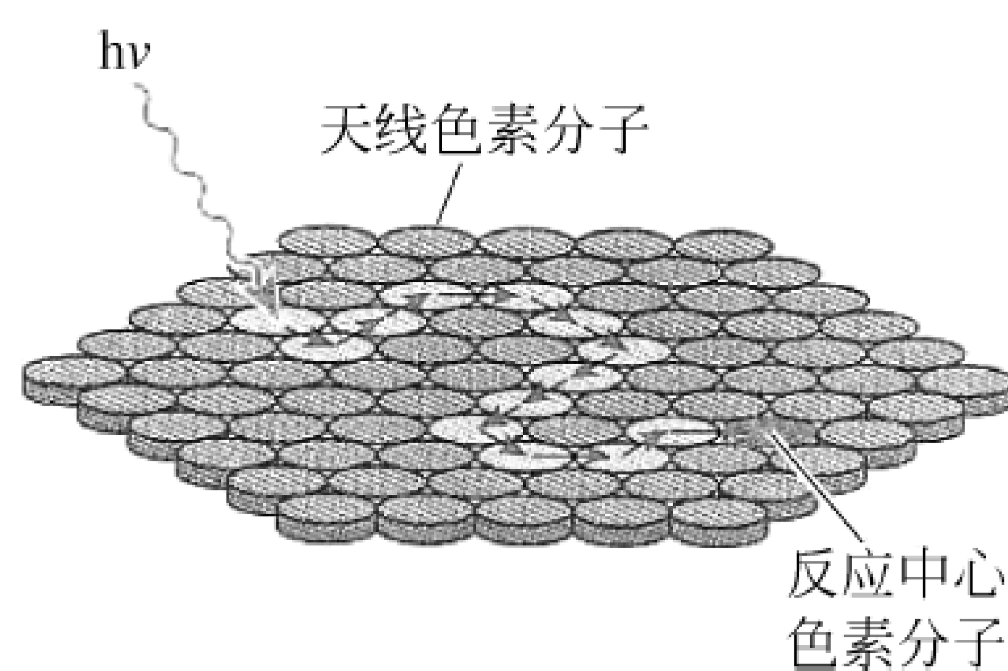


图 17.6 天线色素分子吸收光能并传给反应中心叶绿素分子

17.2 光系统和光反应

在植物和蓝绿藻中光合作用的光反应大都在光系统内进行,涉及两个反应中心:光系统Ⅱ(photosystem Ⅱ,PSⅡ)和光系统Ⅰ(photosystem Ⅰ,PSⅠ)。PSⅡ裂解水,PSⅠ还原$NADP^+$。每个光系统独立地被光激活,两个光系统相继催化光驱动的电子从H_2O到$NADP^+$的传递。

一个光系统大约含有200个叶绿素和60个类胡萝卜素分子,以及1个由蛋白质复合物(特殊的电子传递分子)和特殊Chl a分子组成的反应中心。PSⅠ位于基质类囊体,PSⅡ位于基粒类囊体。根据PSⅠ和PSⅡ反应中心Chl a的最大吸收波长,分别被命名为P700和P680。

除了光系统和LHC之外,其他一些镶嵌在类囊体膜或是与它相连接的成分也参与光反应,其中包括含Mn的Mn复合物(Mn complex)、细胞色素$b_6 f$复合物(cytochrome $b_6 f$ complex)和叶绿体ATP合酶(chloroplast ATP synthase)(图17.7)。

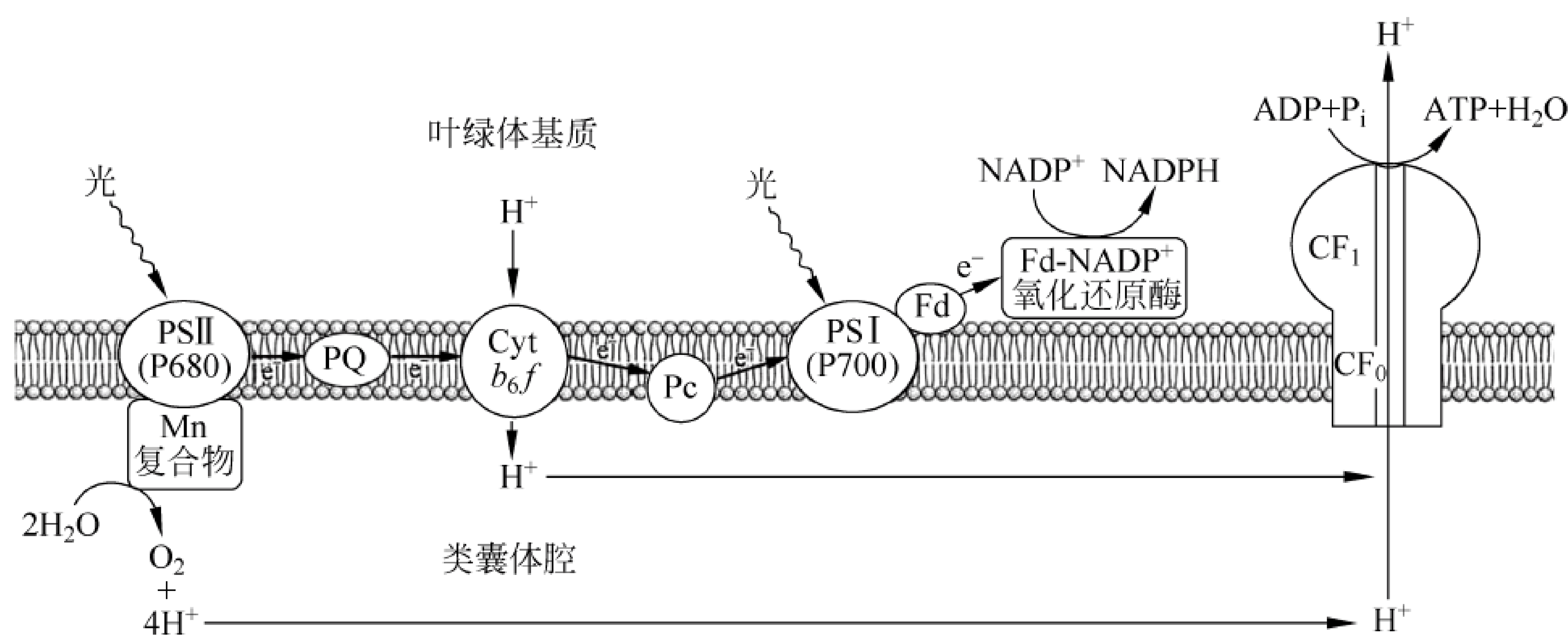
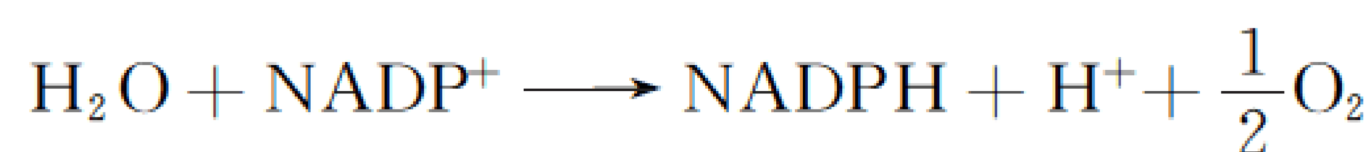


图17.7 类囊体膜中光系统Ⅱ、光系统Ⅰ和ATP合酶之间关系

PQ:质体醌(plastoquinone);Pc:质体蓝素;Fd:铁氧还蛋白

光反应就像图17.7所示的那样,在Mn复合物催化下,H_2O裂解产生的电子经PSⅡ、一系列中间载体和PSⅠ,最后传递给$NADP^+$;而一部分质子在电子传递过程中从基质被转移到类囊体腔内,与腔内H_2O裂解生成的质子形成了腔内高、腔外(基质)低的质子浓度梯度。腔内质子经ATP合酶的质子通道流回基质,同时驱动ATP的合成。



$$H_2O + NADP^+ \longrightarrow NADPH + H^+ + \frac{1}{2}O_2$$



$$ADP + P_i \longrightarrow ATP$$

图17.7给出的只是光反应的一个轮廓图,实际上的光反应过程要复杂得多。光反应由两部分组成,通过两个独立,但又有联系的光系统完成的。一部分反应由PSⅡ进行,另一部分由PSⅠ完成。由PSⅡ至PSⅠ的电子传递途径像个Z字形,这种方式传递被称为非循环式电子传递(图17.8)。

首先在光照下,通过属于PSⅡ的Mn复合物催化,2分子水裂解生成1分子O_2、4个H^+和4个电子。O_2通过扩散释放到大气中,4个H^+释放到类囊体腔内,4个电子进入

电子传递系统。Mn 复合物中由 4 个锰离子组成的锰离子簇传递水裂解产生的 4 个电子，然后电子转移给 PSⅡ 反应中心的一个蛋白亚基上的 Tyr 残基（Tyr 的氧化形式为自由基 Tyr·$^+$），经 Tyr 转移给非常强的氧化剂 P680$^+$（P680 失去电子的氧化形式），P680$^+$ 被还原为 P680（图 17.9）。

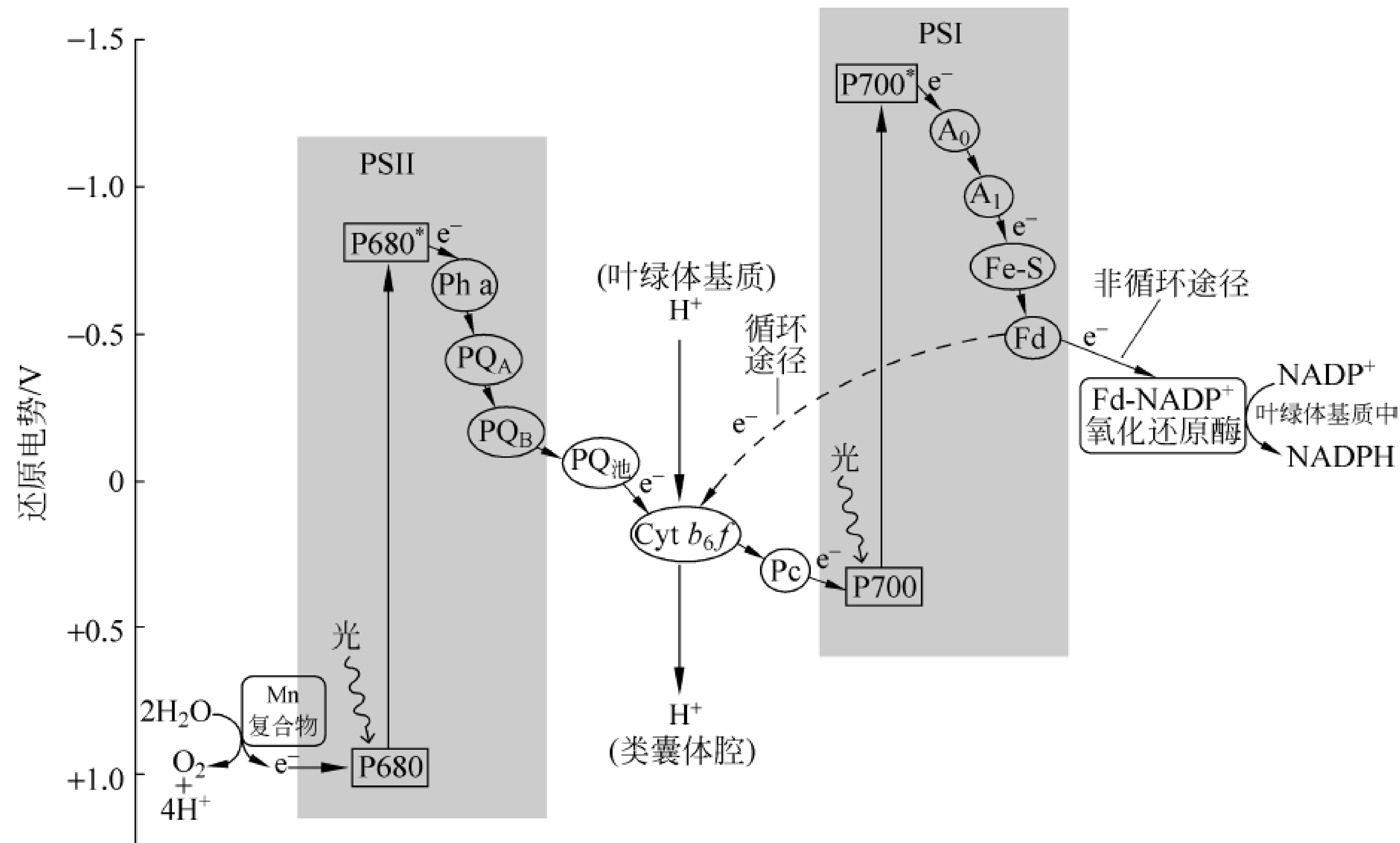


图 17.8　Z 字形电子传递

虚线为循环式电子传递途径。Pha：脱镁叶绿素；PQ_A：质体醌 A；PQ_B：质体醌 B；A_0：特殊的叶绿素；A_1：叶绿醌

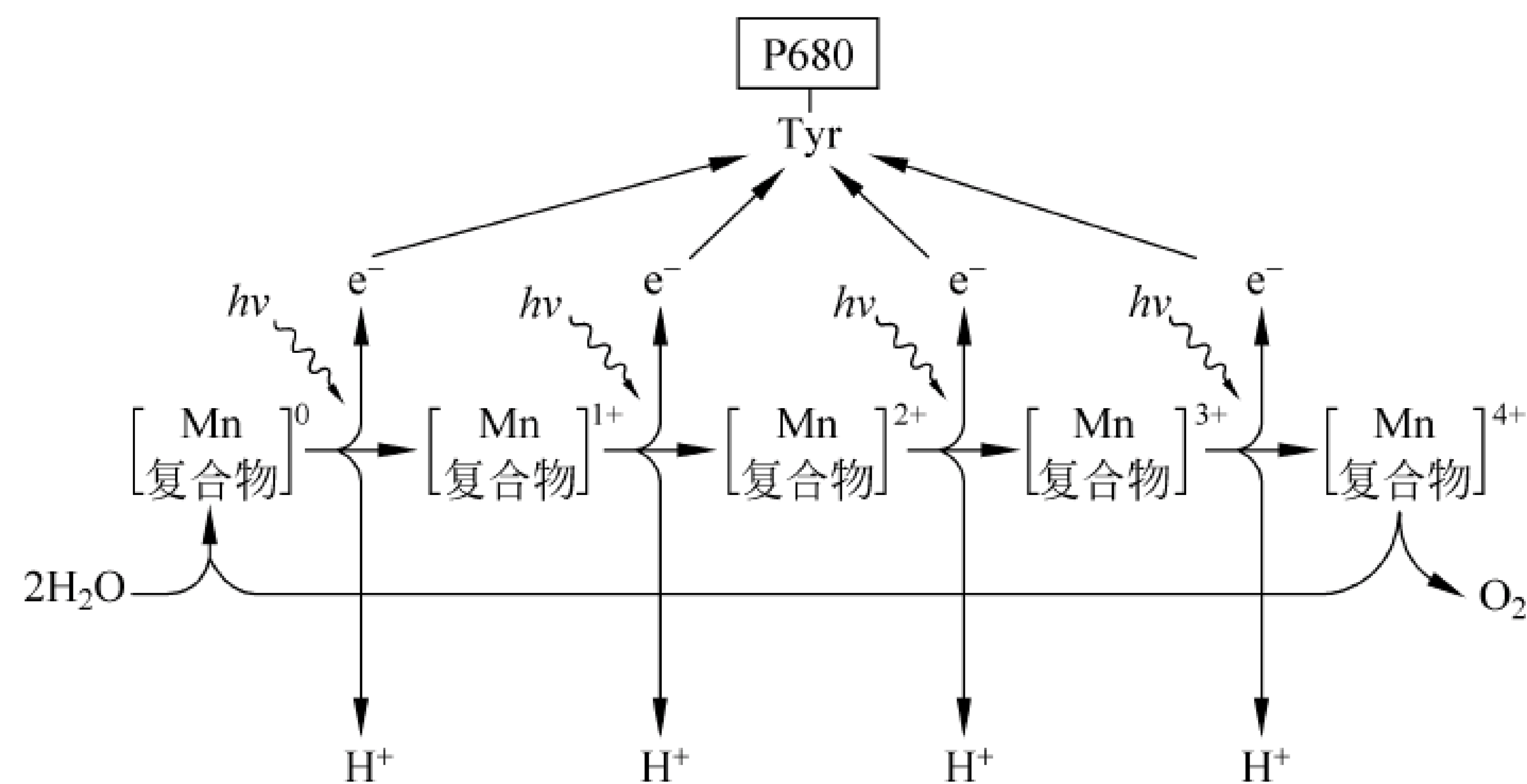


图 17.9　Mn 复合物裂解水和电子传递

接下来如图 17.8 所示的那样，P680 在光激发下变成激发态 P680*，然后来自 P680* 的电子沿着 Ph a→PQ_A→PQ_B→PQ→Cyt b_6f →Pc 传递路线传递给 PSI 中的电子受体 P700$^+$，P700$^+$ 被还原为 P700，再经光激发变成能量更高的 P700*，然后电子沿着 P700*→A_0→A_1→Fe-S 传递给 Fd。在 Fd-NADP$^+$ 氧化还原酶催化下，还原型 Fd 使 NADP$^+$ 还原为 NADPH。

PQ_A 结构类似于线粒体的 CoQ,其作用也是转移电子和质子(图 17.10)。Pc 是个含铜蛋白质,靠铜原子氧化态 Cu(Ⅱ)和 Cu(Ⅰ)之间的变化传递电子,还原型 Pc 可以在类囊体膜中侧向移动,穿梭于细胞色素 b_6f 和 PSI 之间。

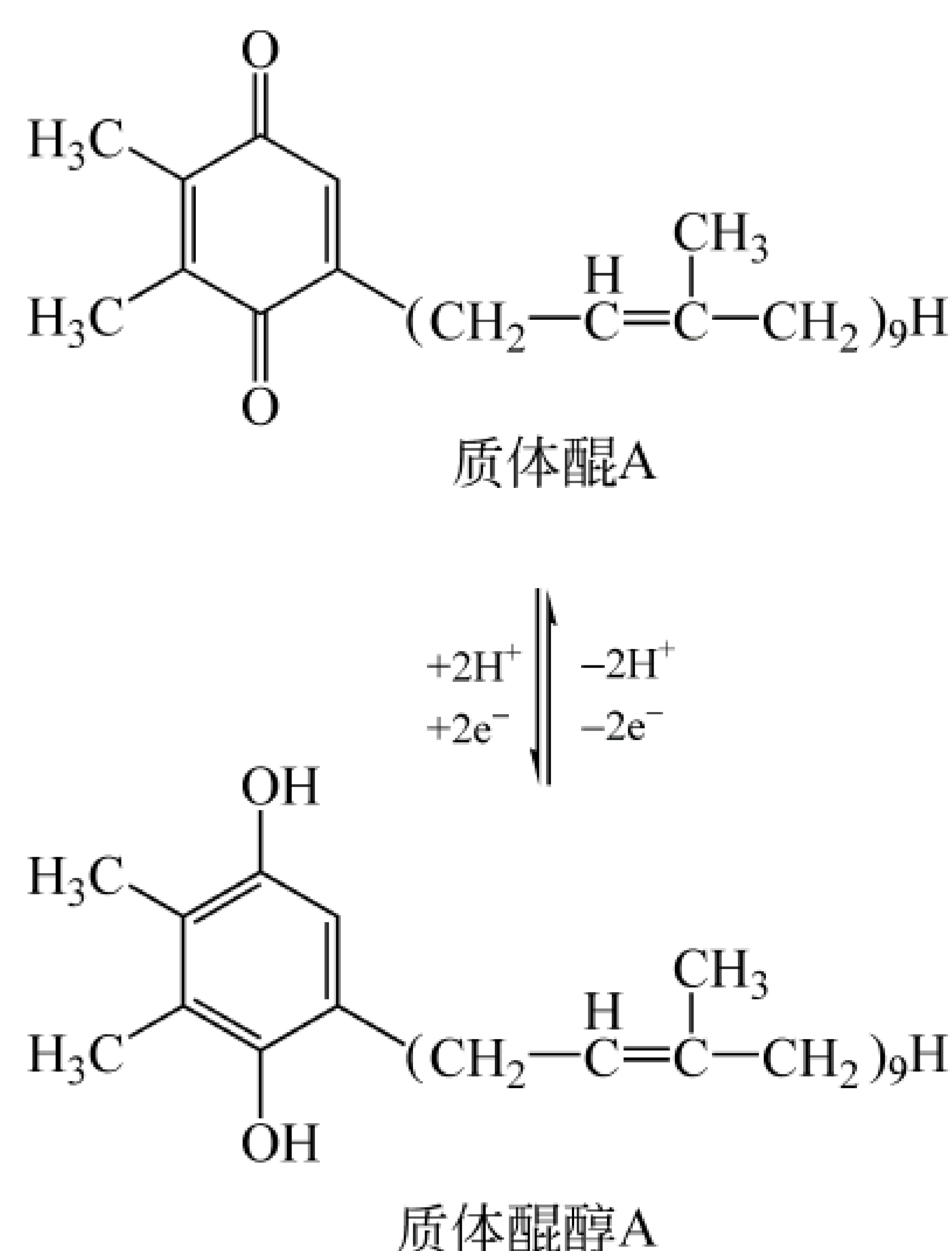


图 17.10　质体醌 A 结构和它的还原型质体醌醇 A

如果电子像图 17.8 中虚线所示那样传递,即可溶性的还原型铁氧还蛋白不再将电子转移给 $NADP^+$,而是返还到 Cyt b_6f 复合物,然后经 Fc 将电子提供给 P700。P700 在光照下将电子传递给铁氧还蛋白。结果在光照下,PSⅠ可以使电子不断地从反应中心流出,然后再流回来。实际上每个电子都是在被吸收的光能推动下进入循环。这种传递方式只涉及 PSⅠ,不涉及 PSⅡ,被称为循环式电子传递。

循环式电子传递可使 Cyt b_6f 复合物将基质中的质子泵入腔内,进一步增加质子浓度梯度,使 ADP 磷酸化生成 ATP,增加 ATP 合成。一般来说,非循环式和循环式电子传递的相对速率受 NADPH 和 $NADP^+$ 的相对含量的影响,当基质中 $NADPH/NADP^+$ 比例高时,非循环式电子传递的速率受到限制,循环式电子传递活跃。

17.3　光合磷酸化

在线粒体中讨论了电子传递和氧化磷酸化偶联,电子传递导致的质子浓度梯度驱动 ATP 合成。光合作用中的电子传递与光合磷酸化偶联也可以用化学渗透假说解释,叶绿体由 ADP 和 P_i 合成 ATP,并已得到证明。

质子浓度梯度驱动 ATP 合成可以通过一个简单实验证明。例如将分离到的一个叶绿体放到 pH4 的缓冲液中平衡数小时,使叶绿体内部的 pH 也达到 4,然后提高 pH 到 8,同时添加 ADP 和 P_i,就会产生 ATP(图 17.11)。此时 ATP 产生并不需要光,因为 pH 差别产生的质子梯度提供了 ADP 磷酸化生成 ATP 的驱动力。

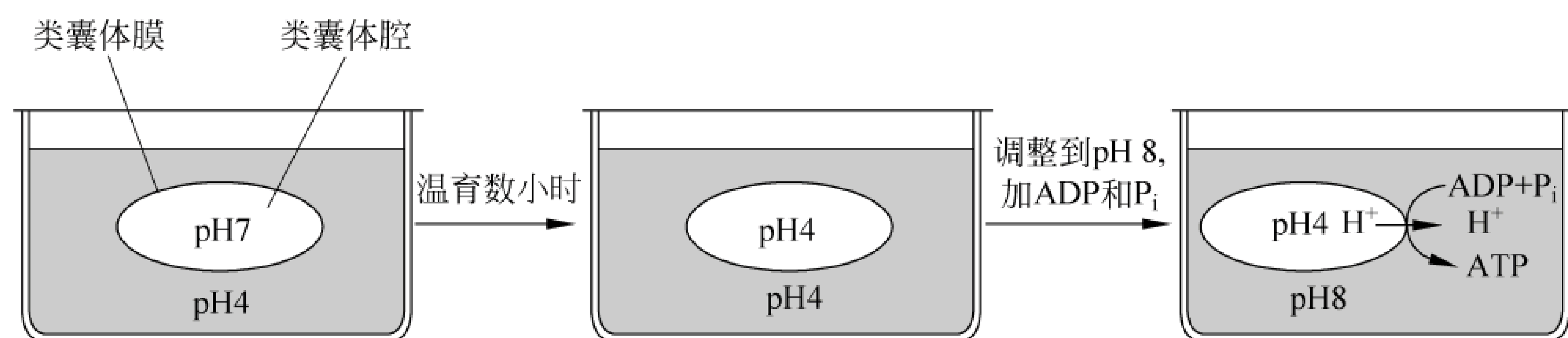


图 17.11　质子浓度梯度驱动 ATP 合成

非光照条件下,通过改变叶绿体内外 pH 产生质子梯度,在有 ADP 和 P_i 存在下叶绿体合成 ATP

从图 17.7 看到,在从 PSⅡ至 PSⅠ的电子传递中有 3 处改变了基质和类囊体腔之间的质子分布:一是来自于水的质子通过 Mn 复合物释放到腔中;二是当 PQH_2 经 Cyt b_6f 复合物氧化时产生于基质中的质子被转移到腔内;三是由于 $NADP^+$ 氧化消耗了质子,使得基质中的质子

浓度降低。另外,在循环式电子传递中,电子不再转移给 $NADP^+$ 生成 NADPH,而是通过电子循环使得 Cyt $b_6 f$ 复合物将基质中的质子泵入腔内,也可进一步增加质子浓度梯度。

由于跨类囊体膜质子梯度的存在,跨膜的 ATP 合酶催化 ADP 和 P_i 合成 ATP。因为这个过程是依赖于光的过程,所以光合 ATP 的形成称为光合磷酸化(photophosphorylation)。叶绿体的 ATP 合酶是类似于线粒体 ATP 合酶的多蛋白复合物,由 CF_0 和 CF_1 两个主要部分组成,跨越类囊体膜形成一个质子通道,伸向基质,催化 ADP 和 P_i 形成 ATP。

17.4 暗反应

在光合作用的暗反应阶段,反应不是直接依赖于光,而是消耗光反应产物 ATP 和 NADPH,使 CO_2 还原转化为生成糖的过程。整个暗反应包括 3 个主要阶段:一是 CO_2 受体分子固定大气中 CO_2,二是将固定的 CO_2 还原为糖,三是 CO_2 受体分子重新生成。CO_2 还原生成糖的途径称为还原性戊糖磷酸循环(reductive pentose phosphate cycle,RPP cycle),或 C_3 途径(因途径中的第一个中间产物是一个三碳分子),由于该循环由 Melvin Calvin 提出,所以也称为 Calvin 循环,Calvin 因此贡献获得了 1961 年诺贝尔化学奖。

Calvin 循环的底物是 CO_2,CO_2 可以直接扩散到光合作用的细胞内。在陆生脉管植物中,CO_2 通过称为气门的表面结构进入光合作用细胞。

17.4.1 Calvin 循环

Calvin 循环中最重要的酶是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-disphosphate carboxylase/oxygenase,Rubisco)。酶的名称反映了 Rubisco 催化 CO_2,或 O_2 与核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)反应。Rubisco 位于叶绿体基质内,其含量占叶绿体总蛋白的 15%以上,是自然界中最丰富的酶之一。Rubisco 很大,在高等植物中是一个 550kD 的异(聚)多亚基($\alpha_8\beta_8$)复合物,由 8 个同一的大亚基(50kD)和 8 个同一的小亚基(15kD)组成。大亚基是酶的催化单位,它可结合底物(CO_2 和 RuBP)和 Mg^{2+}(催化活性必需离子)。小亚基可调节酶的活性,可使 k_{cat}增加到 100 倍以上。

Calvin 循环分为两个阶段:第一阶段是产物甘油醛-3-磷酸生成阶段,为了方便说明,使 3 分子核酮糖-1,5-二磷酸与 3 分子 CO_2 反应生成 6 分子甘油醛-3-磷酸。这一阶段相当于由 3 分子 CO_2 合成了 1 分子甘油醛-3-磷酸,甘油醛-3-磷酸可以用于合成葡萄糖或其他有机物。第二阶段是 CO_2 载体核酮糖-1,5-二磷酸再生阶段,第一阶段生成的其余 5 分子甘油醛-3-磷酸经一系列碳重新组合生成 3 分子核酮糖-1,5-二磷酸(图 17.12)。

图 17.12 中的反应可归纳如下。

第一阶段:生成甘油醛-3-磷酸



$3CO_2$+3 核酮糖-1,5-二磷酸+H_2O ⟶ 6×3-磷酸甘油酸



6×3-磷酸甘油酸+6ATP ⟶ 6×1,3-二磷酸甘油酸+6ADP

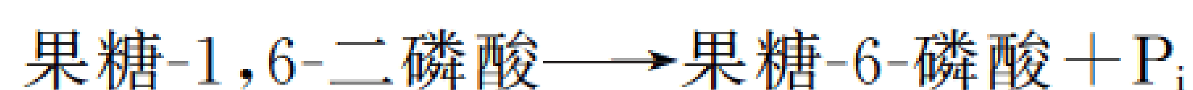


6×1,3-二磷酸甘油酸+6NADPH+$6H^+$ ⟶ 6 甘油醛-3-磷酸+6NADP+$6P_i$

第二阶段:核酮糖-1,5-二磷酸再生



甘油醛-3-磷酸+磷酸二羟丙酮 ⟶ 果糖-1,6-二磷酸



果糖-1,6-二磷酸 ⟶ 果糖-6-磷酸+P_i

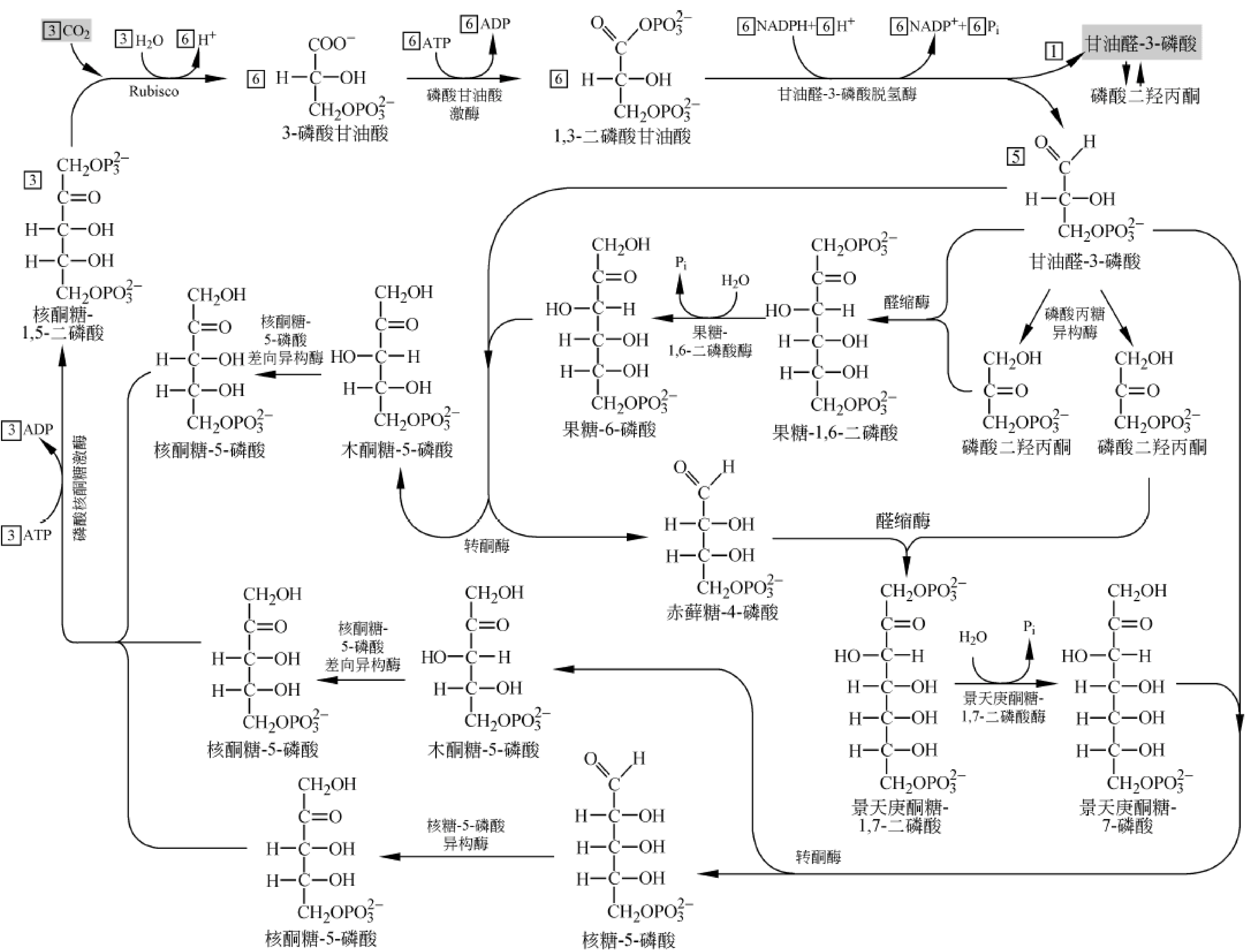


图 17.12 Calvin 循环

果糖-6-磷酸＋甘油醛-3-磷酸⟶木酮糖-5-磷酸＋赤藓糖-4-磷酸

赤藓糖-4-磷酸＋磷酸二羟丙酮⟶景天庚酮糖-1,7-二磷酸

景天庚酮糖-1,7-二磷酸⟶景天庚酮糖-7-磷酸＋P_i

景天庚酮糖-7-磷酸＋甘油醛-3-磷酸⟶木酮糖-5-磷酸＋核糖-5-磷酸

核糖-5-磷酸⟶核酮糖-5-磷酸

2 木酮糖-5-磷酸⟶2 核酮糖-5-磷酸

3 核酮糖-5-磷酸＋3ATP⟶3 核酮糖-1,5-二磷酸＋3ADP

经过两个阶段的暗反应后,净反应可写成如下形式。



$3CO_2+9ATP+6NADPH+6H^+ +5H_2O \longrightarrow 9ADP+8P_i+6NADP^+ +$甘油醛-3-磷酸

相关话题　构建更有效的 Rubisco

Rubisco 既具有羧化酶活性,又具有加氧酶活性,所以在增强羧化反应的同时,还要抑制氧合反应。世界上许多实验室都试图通过基因工程改造植物,如果成功,制造出更有效的 Rubisco,那将会大大增加农作物产量。

酶的催化效率常用 $k_{cat}/K_m(mol^{-1}s^{-1})$表示,效率最高的酶其 k_{cat}/K_m 可达 10^8 至 10^9。

例如丙糖磷酸异构酶的 k_{cat}/K_m 为 4×10^8，而延胡索酸酶更高达 10^9。农作物中烟草的羧化酶活性最高，但 k_{cat}/K_m 仅为 3.2×10^5，显然一个“完美”的 Rubisco 的 k_{cat}/K_m 应接近 10^8。这似乎意味着通过基因改造活性部位的关键氨基酸，或对它的侧链进行修饰，就有可能使羧化酶活性提高 1000 倍。但难点之处是选择合适的氨基酸。这需要获取不同作物 Rubisco 的详细结构和氨基酸序列，以及研究氨基酸侧链与底物分子之间接触等催化信息。当然推测过渡态模式也很重要。

然而，几十亿年进化并没有导致更高效的 Rubisco 出现，更别说人类的几十年努力了。所以构建更高效的 Rubisco 从理论上讲行得通，但要实现突破，人类还需走漫长的路。

17.4.2 Calvin 循环的光调控

从上面描述的光反应和暗反应可以看出，当利用光能可生产用于固定 CO_2 的 ATP 和 NADPH 时，Calvin 循环就能进行，而黑暗中不能通过光合作用生产 ATP 和 NADPH 时，即使存在 CO_2，Calvin 循环也不能进行。事实上，没有光就没有 Calvin 循环，表明光间接地激活 Calvin 循环中酶。

Calvin 循环中受到光特殊调节的酶包括：磷酸核酮糖激酶、果糖-1，6-二磷酸酶、景天庚酮糖-1，7-二磷酸酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶。这些酶含有暴露于表面的二硫键，光间接驱动二硫键的还原，引起酶三级结构的变化，导致酶激活。

二硫键还原开始于光驱动的 PSⅠ的电子传递链，当电子传递给 Fd_{ox} 后，使其还原为 Fd_{red}（还原型），然后再使铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶（ferredoxin-thioredoxin reductase，FTR）还原，后者再还原基质中硫氧还蛋白（thioredoxin，T）的二硫键。可溶性的硫氧还蛋白的巯基可使光调节酶的表面二硫键自发地进行巯基-二硫键交换，从而导致酶的激活（图 17.13）。另外硫氧还蛋白还可使糖酵解中的关键酶磷酸果糖激酶-1 失活，因此在植物中光刺激 Calvin 循环的同时，还抑制糖酵解。

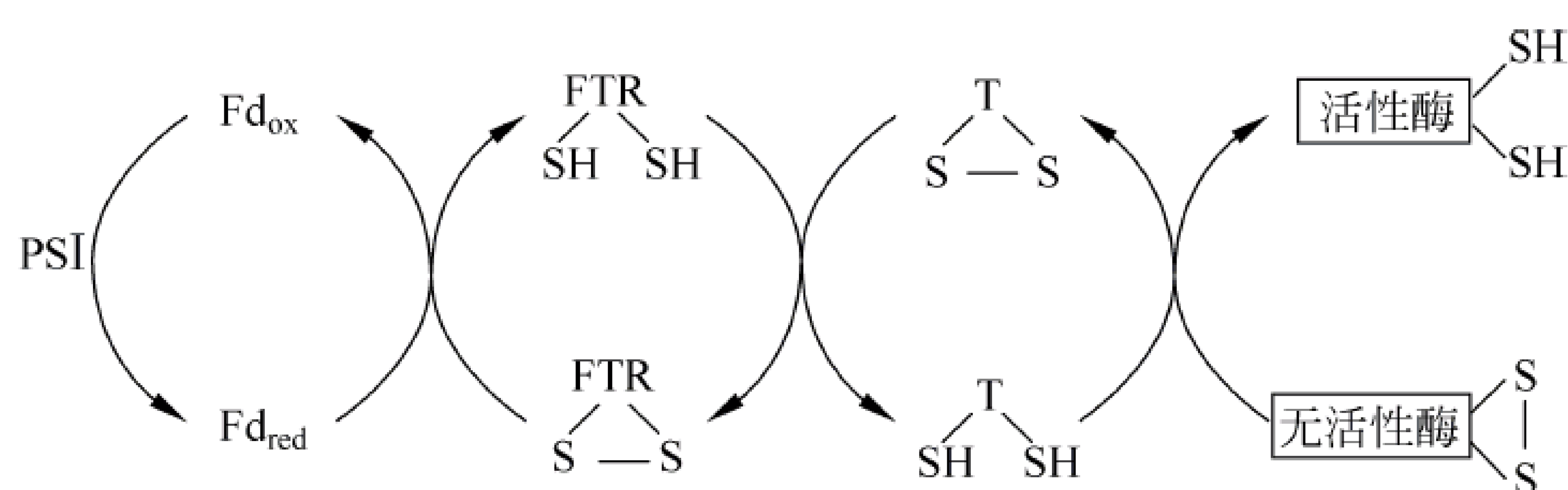


图 17.13 Calvin 循环酶的光调节还原途径

如上所述，所谓“暗反应”不能发生在黑暗中。“暗反应”是为了与由光驱动的生成 NADPH 和 ATP 反应区分开，所以将“暗反应”称为碳同化反应更为恰当。

在光照条件下，由于质子被泵入类囊体腔，基质中 pH 从约 7.0 上升到约 8.0，正是 Rubisco 的最适 pH。另外，光照引起质子流入类囊体腔的同时，Mg^{2+} 流出到基质，Mg^{2+} 激活 Rubisco。景天庚酮糖-1，7-二磷酸酶、果糖-1，6-二磷酸酶也都因 pH 和 Mg^{2+} 浓度的升高而被激活。

17.4.3 植物中淀粉和蔗糖的合成

在大多数光合作用生物中经 Calvin 循环固碳的最主要产物是丙糖磷酸(甘油醛-3-磷酸),而大部分的丙糖磷酸都被转化为淀粉和蔗糖。

1. 淀粉的生物合成

在叶绿体内光合作用的终产物之一就是合成的淀粉,当然在其他细胞器和组织中,如植物中的淀粉(质)体(种子、根和块茎等)也可以合成。淀粉合成中葡萄糖聚合反应机制类似于糖原合成过程。不过其活性糖苷是 ADP-葡糖,而不是糖原合成中的 UDP-葡糖。

来自于 Calvin 循环的甘油醛-3-磷酸经由糖异生途径合成的主要产物是葡糖-6-磷酸,然后葡糖-6-磷酸在磷酸葡糖变位酶催化下转化为葡糖-1-磷酸。在 ADP-葡糖焦磷酸化酶催化下葡糖-1-磷酸被激活生成活性糖苷 ADP-葡糖。最后在淀粉合酶催化下,将葡萄糖残基由 ADP-葡糖转移到作为引物的淀粉的非还原端。延伸的多糖链上每加上一个葡萄糖残基就消耗一分子 ATP,ATP 由光反应提供(图 17.14)。

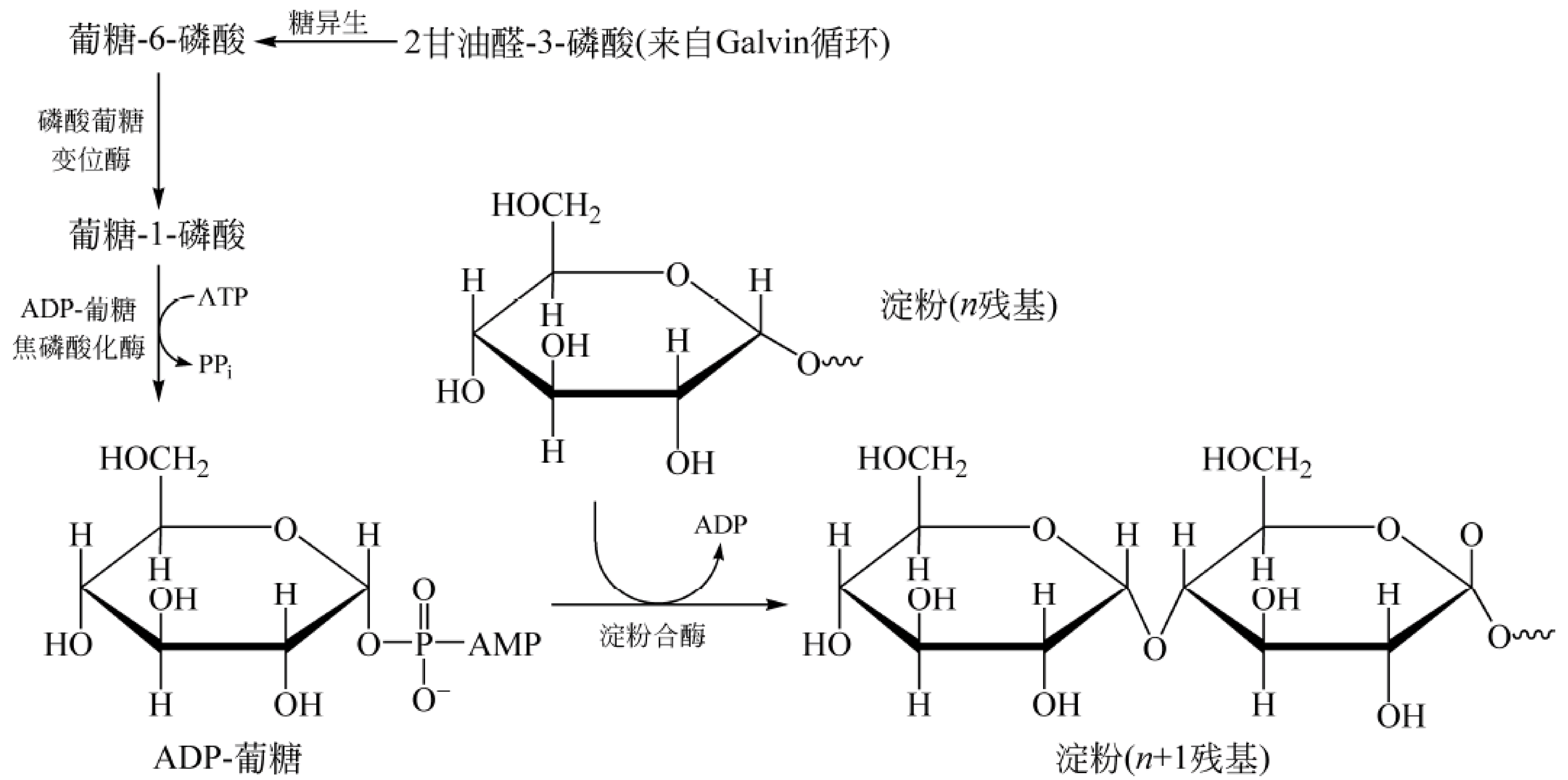


图 17.14 淀粉的生物合成

2. 蔗糖的生物合成

蔗糖是植物体内碳水化合物的流动形态,它在含有叶绿体的细胞(即叶肉细胞)的胞质溶胶中合成,然后输送到维管系统,被非光合作用器官(例如根、种子等)吸收。从功能上讲,蔗糖的功能等价于葡萄糖。

图 17.15 给出了蔗糖生物合成的一系列反应。4 分子甘油醛-3-磷酸可以合成一分子的蔗糖。甘油醛-3-磷酸沿着糖异生途径缩合为一分子果糖-1,6-二磷酸,然后它水解生成果糖-6-磷酸。果糖-6-磷酸异构化形成葡糖-6-磷酸,然后转换为葡糖-1-磷酸后与 UTP 反应形成活性糖苷 UDP-葡糖。最后,果糖-6-磷酸与 UDP-葡糖结合形成蔗糖-6-磷酸,磷酸水解后形成蔗糖。

蔗糖被非光合作用细胞吸收后,可再被降解生成葡萄糖和果糖。这些己糖可以经糖酵解和柠檬酸循环氧化提供能量;也可以作为原料合成淀粉。例如,在根细胞中,蔗糖被转化

为单糖后,被称为淀粉(质)体的特殊细胞器摄入。淀粉(质)体像个改造的叶绿体,但它缺少光合作用的复合物,但仍保留了合成淀粉的酶。在一些植物中,例如土豆、甘蓝和胡萝卜等蔬菜的根细胞都存在着巨大的淀粉库。

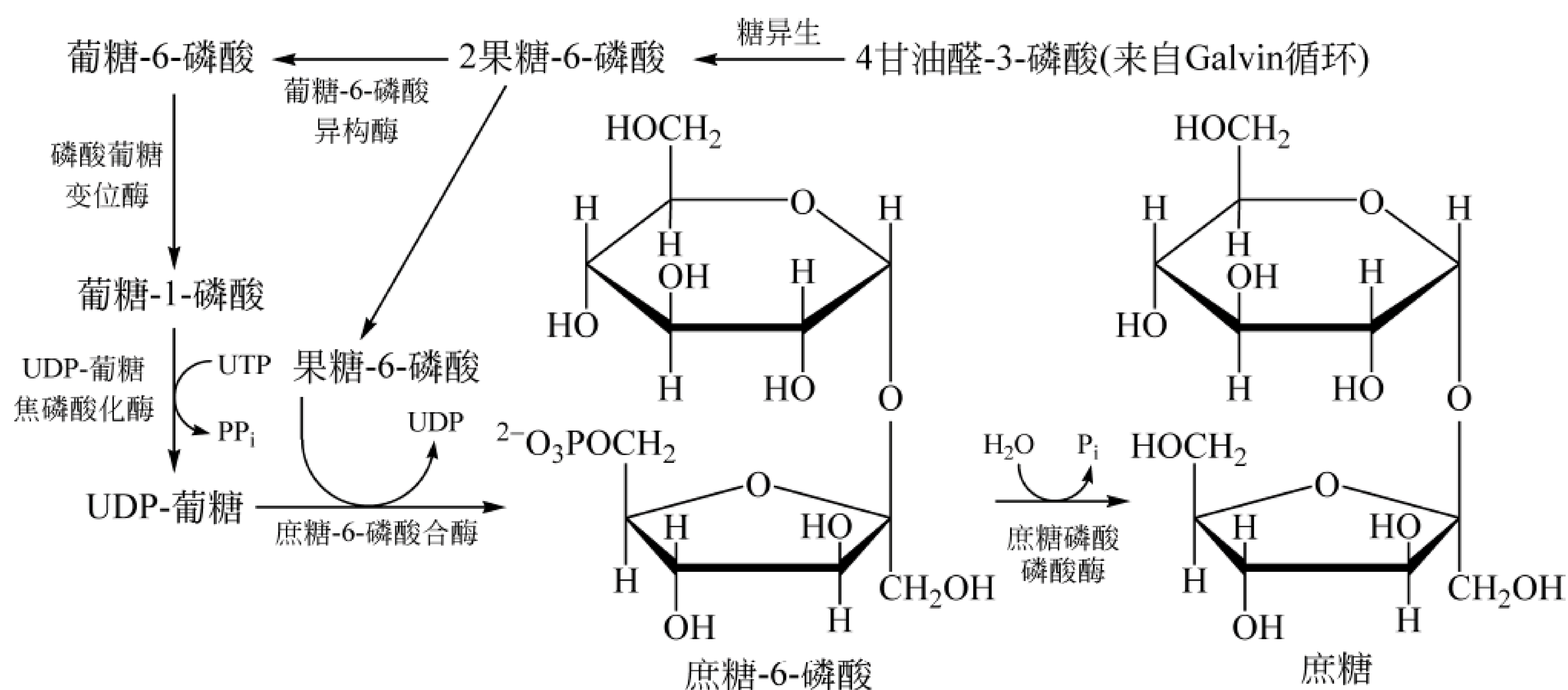


图 17.15 蔗糖的生物合成

4 分子丙糖磷酸($4C_3$)转化为一分子蔗糖(C_{12})

17.5 光呼吸

由于 Rubisco 可以催化 RuBP 与 CO_2 或 O_2 的反应,CO_2 和 O_2 竞争 Rubisco 的活性部位。Rubisco 对 CO_2 的亲和性明显比对 O_2 的亲和性高得多,同时 CO_2 比 O_2 更容易溶解于基质中。不过大气中 O_2(21%)的浓度要比 CO_2(0.03%)高得多。结果,两个反应对于体内的核酮糖-1,5-二磷酸的消耗都有重要的贡献。在正常的条件下,羧化对氧合的比例是 3∶1～4∶1。

Rubisco 氧合反应的产物是 1 分子 3-磷酸甘油酸和 1 分子磷酸乙醇酸(图 17.16)。3-磷酸甘油酸直接进入 Calvin 循环,而乙醇酸代谢最终生成 1 分子 CO_2 和 1 分子可进入 Calvin 循环的 3-磷酸甘油酸。依赖于光的吸收 O_2 和释放 CO_2 的过程称为光呼吸(photorespiration)。

磷酸乙醇酸代谢涉及叶绿体、过氧化物酶体和线粒体 3 个不同的细胞器。首先磷酸乙醇酸在叶绿体中脱磷酸生成乙醇酸,然后进入过氧化物酶体与 O_2 反应生成乙醛酸和 H_2O_2。H_2O_2 在过氧化氢酶的催化下很容易转换成 O_2 和 H_2O,而乙醛酸经转氨生成甘氨酸,然后进入线粒体。在线粒体两个甘氨酸经甘氨酸脱羧酶催化缩合生成丝氨酸,并释放出 CO_2 和 NH_3。CO_2 可经光合作用被固定,或是从叶片释放出去。而 NH_3 可用于形成谷氨酸。丝氨酸由线粒体进入过氧化物酶体,经脱氨形成羟基丙酮酸,然后被还原为甘油酸,进入叶绿体,经磷酸化生成 3-磷酸甘油酸进入 Calvin 循环。

从以上描述可看出,氧合作用对于光合生物是不利的,因为它白白浪费了 CO_2 受体 RuBP,而且还消耗了大量能量。然而到目前为止测定的光合生物中的 Rubisco 都是兼有羧化酶和加氧酶活性。光呼吸对于农作物来说是个严重的问题,因为它限制了作物的产量。

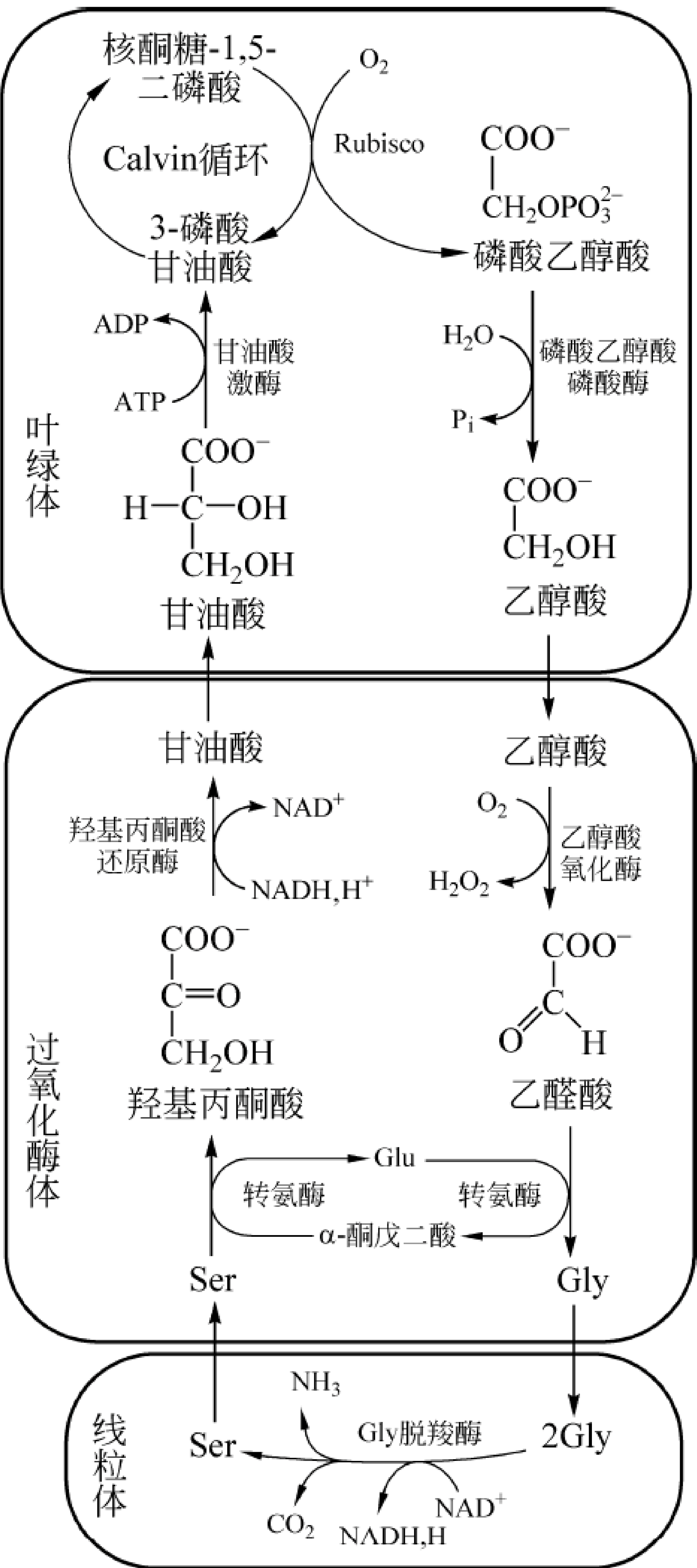


图 17.16　光呼吸

17.6　C_4 途径

一些植物为了避免浪费资源的光呼吸,采取了第二条固碳途径,其效果就是增加局部 CO_2 相对于 O_2 的浓度。这些植物中存在着与 Calvin 循环偶联的第二条固碳途径,涉及叶肉细胞和维管束鞘细胞。该途径中固碳的最初产物是四碳酸(C_4 酸),而不是三碳酸,所以该途径称为 C_4 途径,这类植物称为 C_4 植物。前面描述的 CO_2 与核酮糖-1,5-二磷酸结合生成 3-磷酸甘油酸的植物称为 C_3 植物。C_4 植物包括一些重要的农作物,例如玉米、高粱、甘蔗等,具有 C_4 途径的植物几乎不存在光呼吸。

图 17.17 给出了 C_3 和 C_4 植物叶片的细胞组织。从图中可明显看出 C_3 与 C_4 叶片虽然都含有叶肉细胞和维管束鞘细胞，但 C_4 植物这两类细胞中都含有叶绿体，而 C_3 植物只有叶肉细胞含有叶绿体，维管束鞘细胞不含叶绿体。所以 C_4 植物的光合作用是由叶肉细胞和维管束鞘细胞两类细胞共同执行的。而 C_3 植物的光合作用则是由惟一含叶绿体的叶肉细胞完成的。

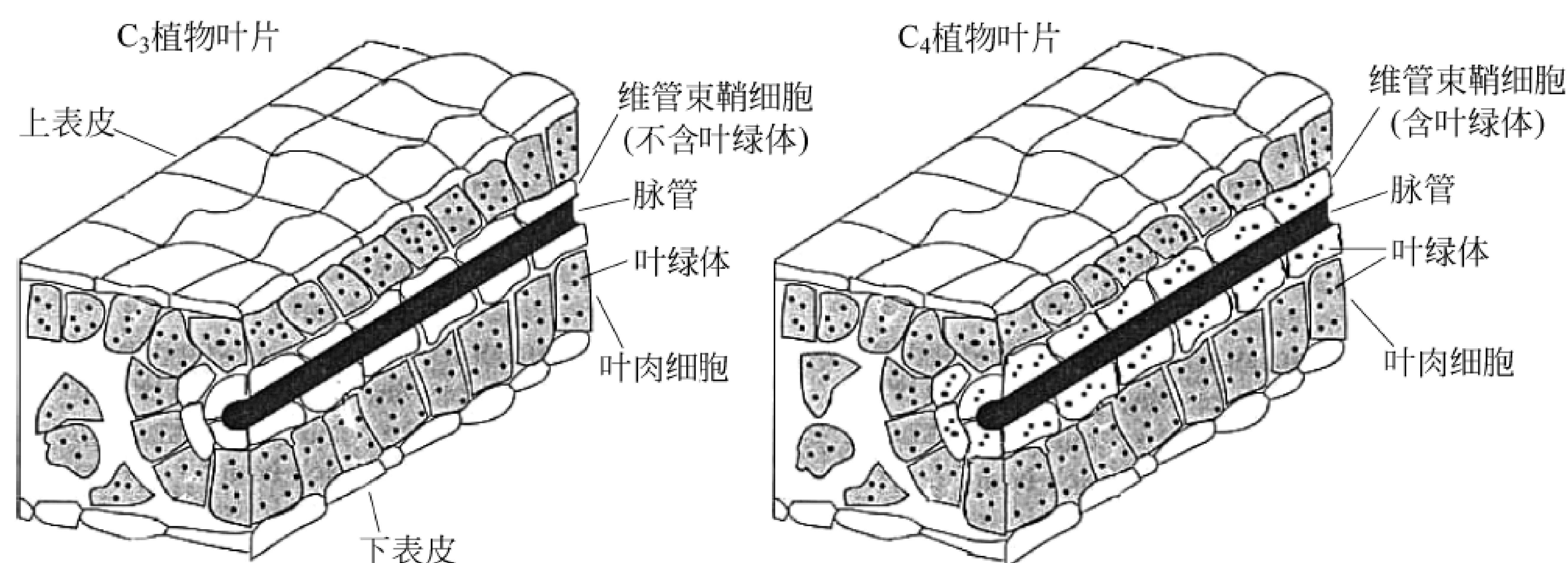


图 17.17 C_3 和 C_4 植物叶片的细胞组织

图 17.18 给出了在叶肉细胞和维管束鞘细胞中进行的 C_4 途径反应。C_4 途径分为羧化和脱羧两个阶段。在起始阶段，CO_2 在叶肉细胞被固定形成四碳酸，第二阶段四碳酸在维管束鞘细胞中脱羧，释放出的 CO_2 再被 Rubisco 固定，进入 Calvin 循环。

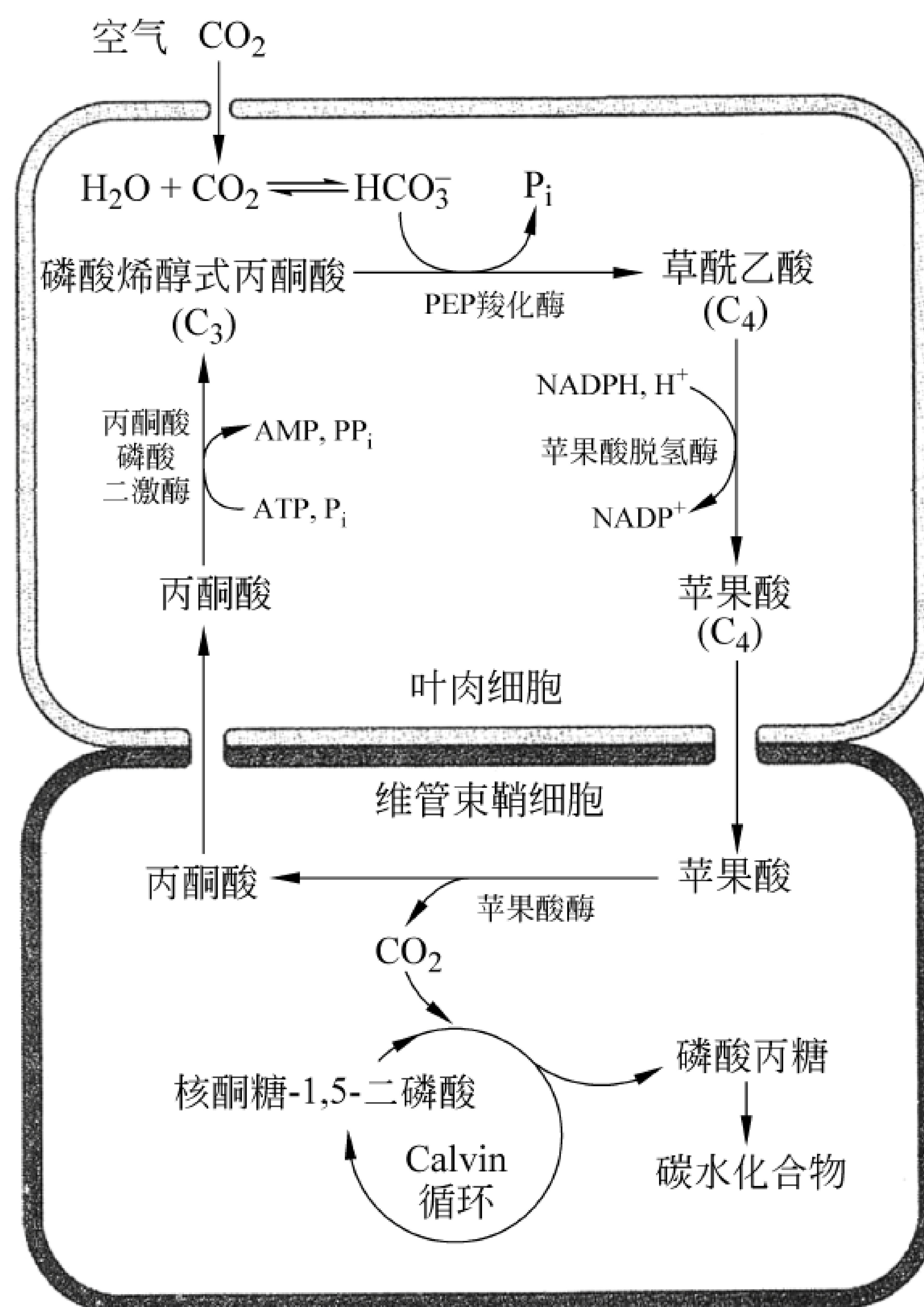


图 17.18 在叶肉细胞和维管束鞘细胞中进行的 C4 途径反应

首先在叶肉细胞的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEP羧化酶)催化下,CO_2(以HCO_3^-形式)与磷酸烯醇式丙酮酸进行羧化反应生成草酰乙酸(C_4酸)。由于叶肉细胞中不含Rubisco,所以生成的草酰乙酸在苹果酸脱氢酶催化下形成苹果酸,经胞间连丝被转运到相邻含Rubisco的维管束鞘细胞中进行Calvin循环反应。

进入维管束鞘细胞的苹果酸经苹果酸酶催化,氧化脱羧生成丙酮酸和CO_2。释放的CO_2(就是在叶肉细胞中固定的那个CO_2)在Rubisco催化下与核酮糖-1,5-二磷酸反应,进入Calvin循环。而生成的丙酮酸被转运回叶肉细胞,经丙酮酸磷酸二激酶催化重新生成磷酸烯醇式丙酮酸。

由于维管束鞘细胞的细胞壁对CO_2气体是不通透的,所以四碳酸脱羧可以大大增加细胞内CO_2的浓度,创造出一个CO_2对O_2的高比例环境,结果使Rubisco的氧合活性被弱化,因此在C_4植物中基本上不存在光呼吸。

许多生活在干旱环境中的某些植物存在着一个改进的C_4途经,能够在光合作用期间大大地减少水分的丢失。该途经最大特征是将吸收CO_2与进行Calvin循环在时间上错开,在夜间吸收CO_2,利用C_4途经的反应以苹果酸形式储存CO_2。当在白天,光反应形成ATP和NADPH时,储存的苹果酸脱羧产生的CO_2进入Calvin循环。在苹果酸脱羧期间,气孔是紧密关闭的,为的是不使水分和CO_2从叶片中跑掉(图17.19)。

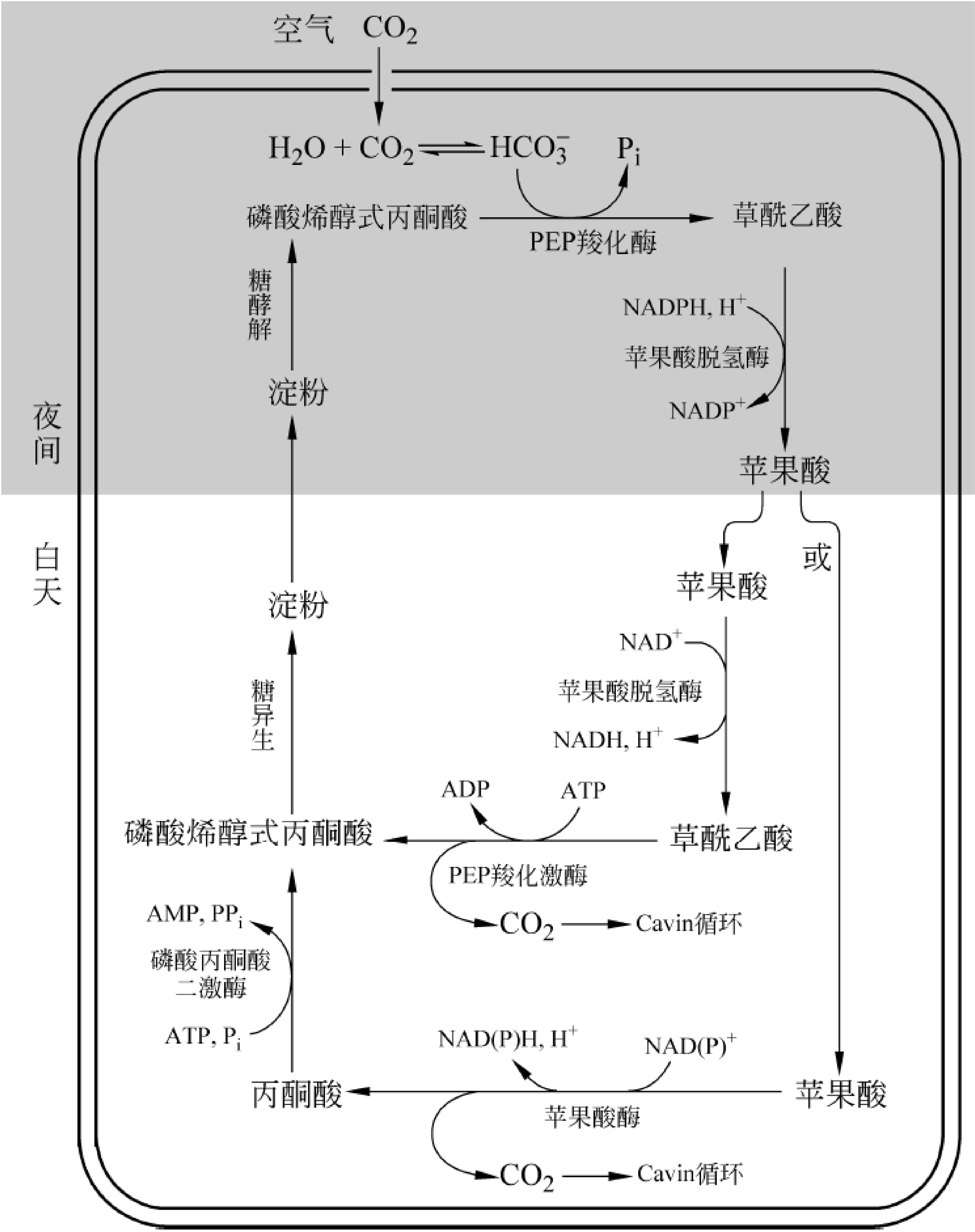


图17.19 景天酸代谢

由于与夜间苹果酸积累有关的反应过程最初是在景天族(crassulaceae)植物中发现的，所以这一过程称为景天酸代谢(crassulacean acid metabolism，CAM)。除了景天以外，仙人掌、凤梨科植物和兰花等植物中也存在着CAM。

小结

1. 光合作用包括生成NADPH和ATP的依赖于光的电子传递过程(光反应)和利用NADPH和ATP将大气中CO_2转化为糖的过程(暗反应)。

2. 催化光反应的酶和辅助因子镶嵌在类囊体膜或与其相连。糖的合成在叶绿体基质中进行。

3. 叶绿素和辅助色素组成集光复合物，吸收光能并将光能转移给光系统反应中心的一对特殊叶绿素分子。

4. Mn复合物裂解水，来自水裂解的电子在光能驱动下经锰离子簇传递给PSⅡ，再通过一系列电子载体和PSⅠ转移给$NADP^+$，使其还原为NADPH。在电子传递的同时质子被跨膜转移到类囊体腔中。

5. 叶绿体ATP合酶利用质子浓度梯度的能量催化ADP和P_i转换为ATP。

6. 利用光反应生成的NADPH和ATP，大气中CO_2经Calvin循环合成糖。Rubisco催化循环的第一个固定CO_2的反应。在Calvin循环第一阶段，CO_2与核酮糖-1，5-二磷酸反应最终生成甘油醛-3-磷酸。第二阶段是使CO_2的受体RuBP再生。

7. 淀粉和蔗糖是光合作用的主要产物。甘油醛-3-磷酸经糖异生途径生成葡糖-6-磷酸后，转化为葡糖-1-磷酸，再被ATP激活形成活性糖苷ADP-葡糖。最后葡萄糖残基由活性糖苷转移到已存在的淀粉引物的非还原末端。蔗糖由甘油醛-3-磷酸经糖异生生成的果糖-6-磷酸和葡糖-6-磷酸生成。

8. Rubisco还催化核酮糖-1，5-二磷酸氧合的光呼吸反应。光呼吸是个利用光反应生成的ATP和NADPH，消耗CO_2受体RuBP，降低固碳效率的途径。

9. C_4植物由于浓缩CO_2，降低Rubisco的氧合作用，可提高固定CO_2的效率。

习题

1. 除莠菌素二氯苯二甲基脲(DCMU)可阻断光合作用中由PSⅡ到细胞色素*bf*复合物的电子传递。

(a) 当将DCMU加到分离出的叶绿体时，会同时停止O_2生成和光合磷酸化作用吗？

(b) 如果加入可使$P680^*$重新氧化的外部电子受体，这会影响O_2产生和光合磷酸化吗？

2. 在一定条件下，叶绿体中循环电子传递可以与非循环电子传递同时发生。通过循环电子传递是否产生ATP、O_2或NADPH？

3. 叶绿体悬液在黑暗中能否由CO_2和H_2O合成葡萄糖？如果不能，必须加入什么物质才能进行葡萄糖合成？假设Calvin循环中所有成员都存在。

4. (a) 在C_4植物中由CO_2合成葡萄糖要比在C_3植物中需要多少额外的ATP？

(b) 尽管需要额外的ATP,为什么 C_4 植物固定 CO_2 的效率要比 C_3 植物高得多?

5. (a)悬浮于pH4.0溶液的叶绿体腔内的pH在数分钟内就可达到pH4.0。为什么当外部溶液的pH快速上升到8.0,同时加入ADP和 P_i 后,就会突然爆发ATP合成?(b)虽然有充足的ADP和 P_i,为什么ATP合成会在几秒钟停止呢?

6. 从哪些方面说(a)核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)是"养活全世界"的酶;(b)Rubisco又被冠以"世界上最不称职的酶和效率低的酶"。

7. 近几十年中大气中的 CO_2 含量一直在增加。如果这一趋势继续下去,对 C_3 和 C_4 植物的相对丰度有何影响?

8. 如果玉米在 $^{14}CO_2$ 气体存在下,受光照射约1s后,在叶子上检测到的90%放射性都出现在苹果酸、天冬氨酸和草酰乙酸的C-4原子上。然而光照60s后,^{14}C 才会出现在3-磷酸甘油酸的C-1原子,请解释这一现象。

9. 需要多少分子ATP(或ATP当量)和NADPH合成(a)一分子葡萄糖(经植物中光合作用 CO_2 固定)和(b)一分子葡萄糖残基(整合到淀粉中)?

10. 研究发现沙漠中一些植物的叶子,在早晨有些酸味,但随着白天的到来,酸味逐渐变为无味,白天过后又有些苦味,你能解释这种现象吗?

18 脂　代　谢

脂类包括脂肪、磷脂、鞘脂和胆固醇等，本章主要描述脂肪的降解和合成。由于脂类的主要成分是脂肪酸，所以脂类代谢实际上是脂肪酸的分解代谢和生物合成。

糖原和脂肪是动物的两个主要储能形式。糖原降解可产生许多能量，但提供的 ATP 仅能使肌肉收缩一小时。然而要维持持久、高强度的运动和工作，例如，候鸟迁徙和马拉松选手竞赛等运动都要依赖脂肪代谢不间断地提供大量的能量。脂肪是无水化合物，与糖和氨基酸相比，脂肪中的脂肪酸的还原程度更高。1g 脂肪可产生 9.0kcal(37.6kJ)热量，1g 糖或蛋白质只产生 4kcal(16.7kJ)热量，脂肪单位热量值最高。

脂肪可以作为燃料提供能量，同时脂肪的氧化还提供了必要的水分。例如长时间行走在沙漠中的骆驼及处于冬眠状态长达 6、7 个月的灰熊，不仅依靠脂肪提供能量维持运动和保持体温，还利用脂肪代谢产生的水来补充呼吸排出的水分。

18.1　脂肪动员和降解

动物脂肪主要储存在脂肪细胞中，主要成分是由脂肪酸和甘油组成的三酰甘油。脂代谢受激素(见本章末相关话题 激素)调控，抑制或激活脂肪酸释放取决于代谢的需要。三酰甘油的降解(或称脂解)受胰岛素的抑制，当血液中的胰岛素水平低时，脂解速率增加；当血液中的肾上腺素水平升高时(例如在禁食或运动时)，脂解进一步受到激活。

图 18.1 给出了肾上腺素调节的三酰甘油降解途径。肾上腺素与β-肾上腺素受体结合，经 G 蛋白激活腺苷酸环化酶，催化 ATP 生成 cAMP。cAMP 激活蛋白激酶 A，使激素敏感性脂酶(hormone sensitive lipase)磷酸化，激活的脂酶催化三酰甘油降解。游离的脂肪酸和甘油通过质膜扩散进入血液，绝大部分甘油在肝中经糖异生途径转化为葡萄糖。脂肪酸难溶于水溶液，主要是与血清清蛋白结合后通过血液转运到心脏、骨骼肌和肝等其他组织中被氧化。

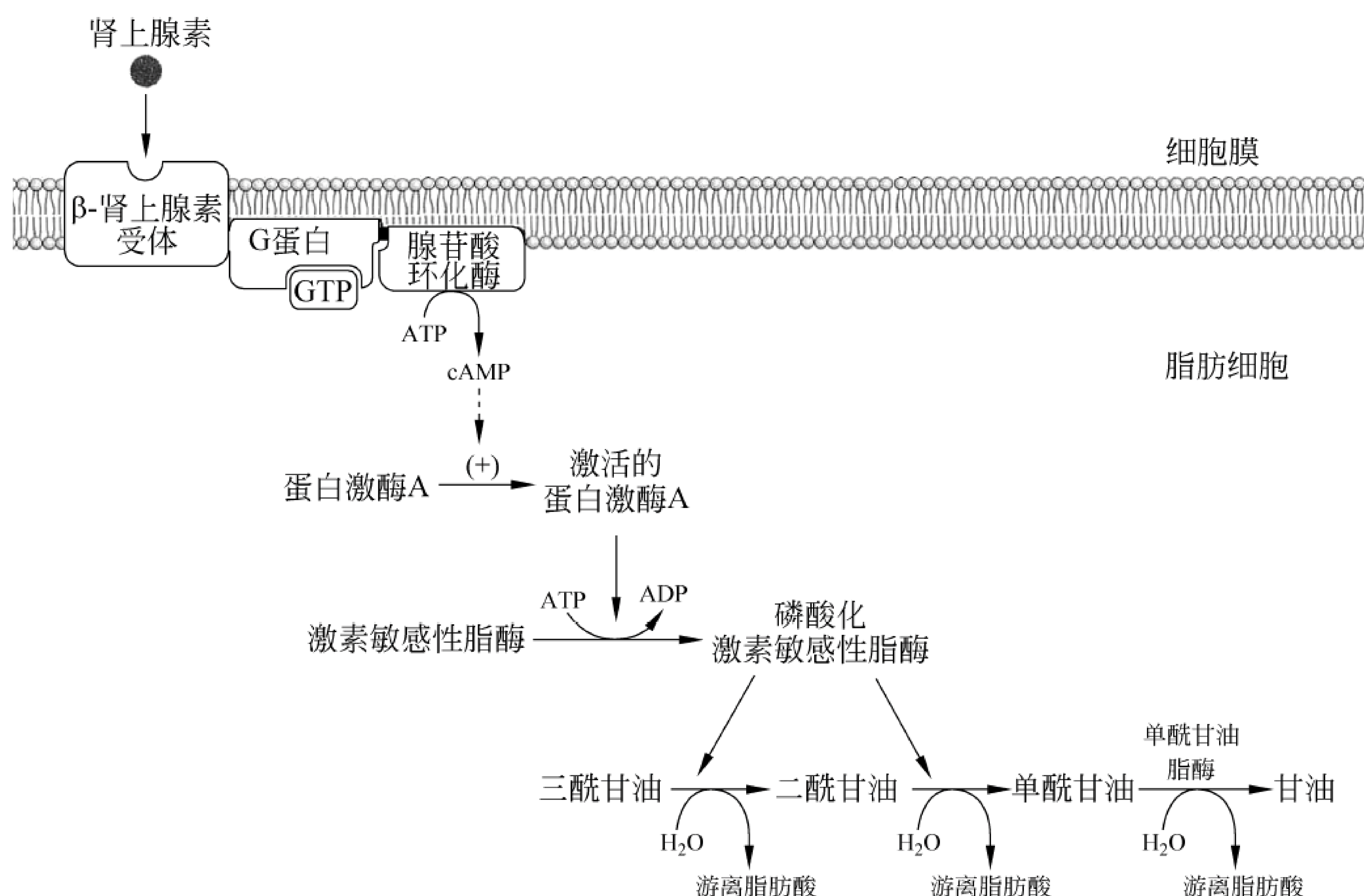


图 18.1　激素调节的三酰甘油降解

18.2　脂肪酸 β-氧化

1904 年,Franz Knoop 做了一个经典的生物化学实验,阐明了脂肪酸降解的途径。Knoop 将末端碳(ω 碳)连有苯基(体内不能降解)的一些脂肪酸衍生物喂狗,然后分离狗尿中的苯化合物。Knoop 发现,当饲以苯基标记的奇数碳脂肪酸时,尿中排出的是苯甲酸结合了甘氨酸后的产物马尿酸;如果饲以苯基标记的偶数碳脂肪酸时,则尿中排出的是苯乙酸结合了甘氨酸后的产物苯乙尿酸(图 18.2)。

根据实验结果 Knoop 推测脂肪酸氧化发生在 β-碳原子上,即每次从脂肪酸链上降解下来的是二碳单位,否则苯乙酸还会进一步降解为苯甲酸。

Knoop 的脂肪酸 β-氧化学说于 1949 年被 Eugene Kennedy 和 Albert Lehninger 证实。同时发现脂肪酸是在线粒体被氧化的,而且脂肪酸在进入线粒体之前要先被激活。

18.2.1　脂肪酸的激活和转运

在酰基 CoA 合成酶(acyl CoA synthetase)[也称为硫激酶(thiokinase)]催化下,脂肪酸与 HS-CoA 生成酰基 CoA,反应发生在胞质溶胶中,需要 ATP(图 18.3)。

在上述反应中,由于产物焦磷酸在无机磷酸酶作用下进一步被水解,因此,生成酰基 CoA 实际上是消耗了两个高能磷酸键。细胞中发现了 4 种不同的酰基 CoA 合成酶,它们分别对带有短的(<C6)、中等长度的(C6～12)、长的(>C12)和更长的(>C16)碳链的脂肪酸具有催化的特异性。

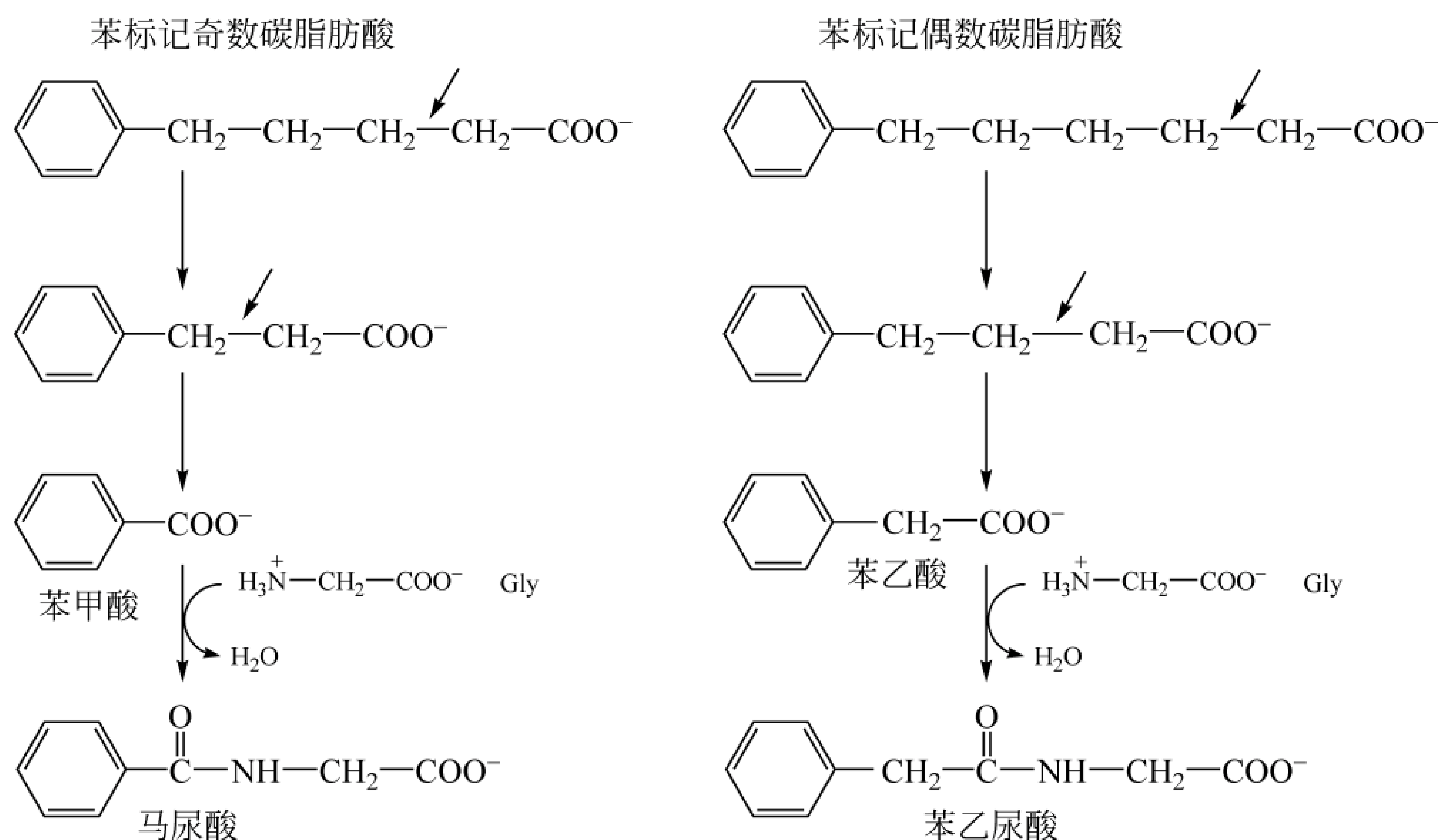


图 18.2 Knoop 的脂肪酸标记实验

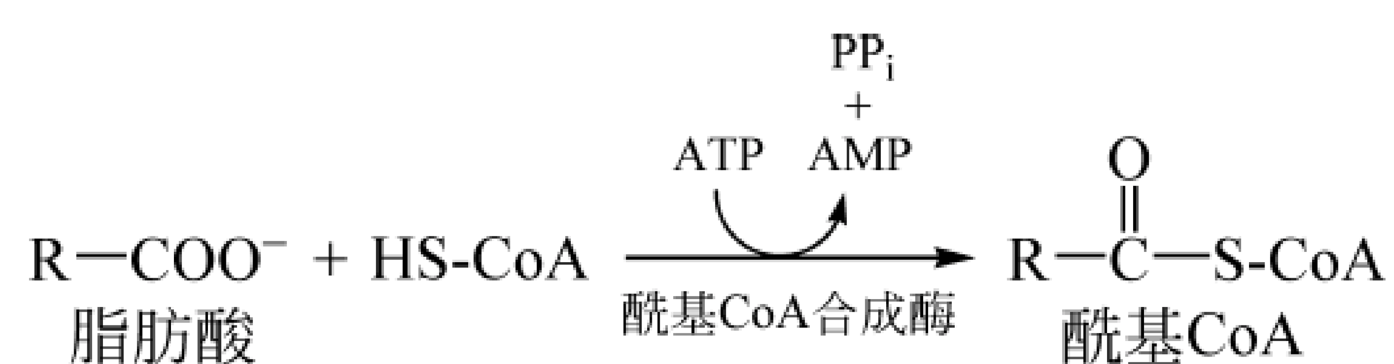


图 18.3 酰基 CoA 合成酶反应

脂肪酸氧化在线粒体基质进行,需要一个转运系统将线粒体外脂肪酸转运到线粒体内(图 18.4)。

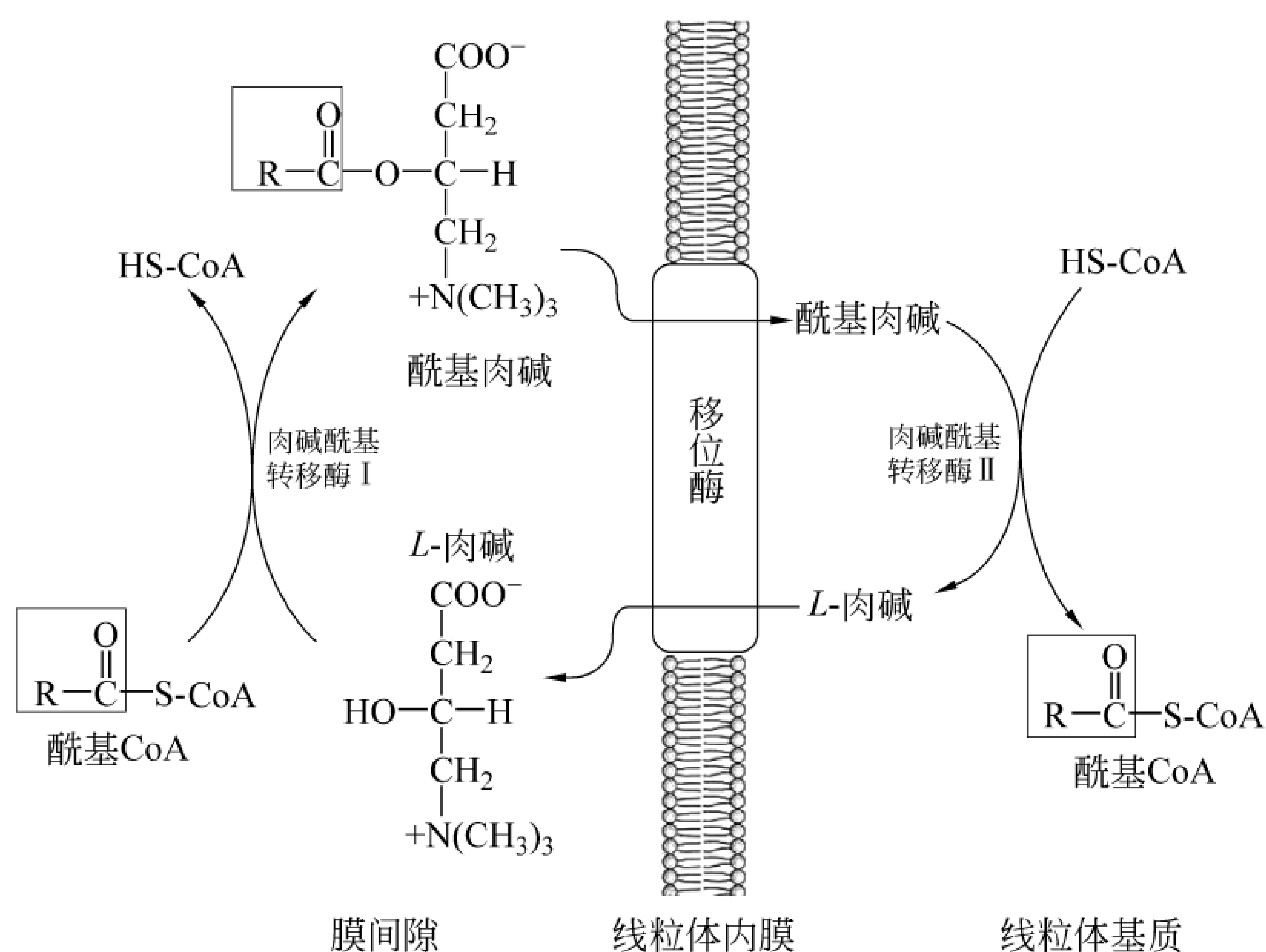


图 18.4 肉碱穿梭系统

首先在位于线粒体内膜外侧的肉碱酰基转移酶Ⅰ(carnitine acyltransferase Ⅰ,CAT Ⅰ)催化下,酰基CoA中酰基转移到*L*-肉碱(carnitine)上,形成酰基肉碱。然后,酰基肉碱经肉碱移位酶(carnitine translocase)进入线粒体基质,在位于线粒体内膜内侧的肉碱酰基转移酶Ⅱ(CAT Ⅱ是CAT Ⅰ的同工酶)催化下,重新生成酰基CoA和*L*-肉碱。总体上看,穿梭系统是将胞质溶胶中的酰基转运到了线粒体内。

18.2.2 脂肪酸β-氧化

酰基CoA的β-氧化涉及4个基本反应:依次进行氧化、水合、氧化和硫解反应(图18.5)。

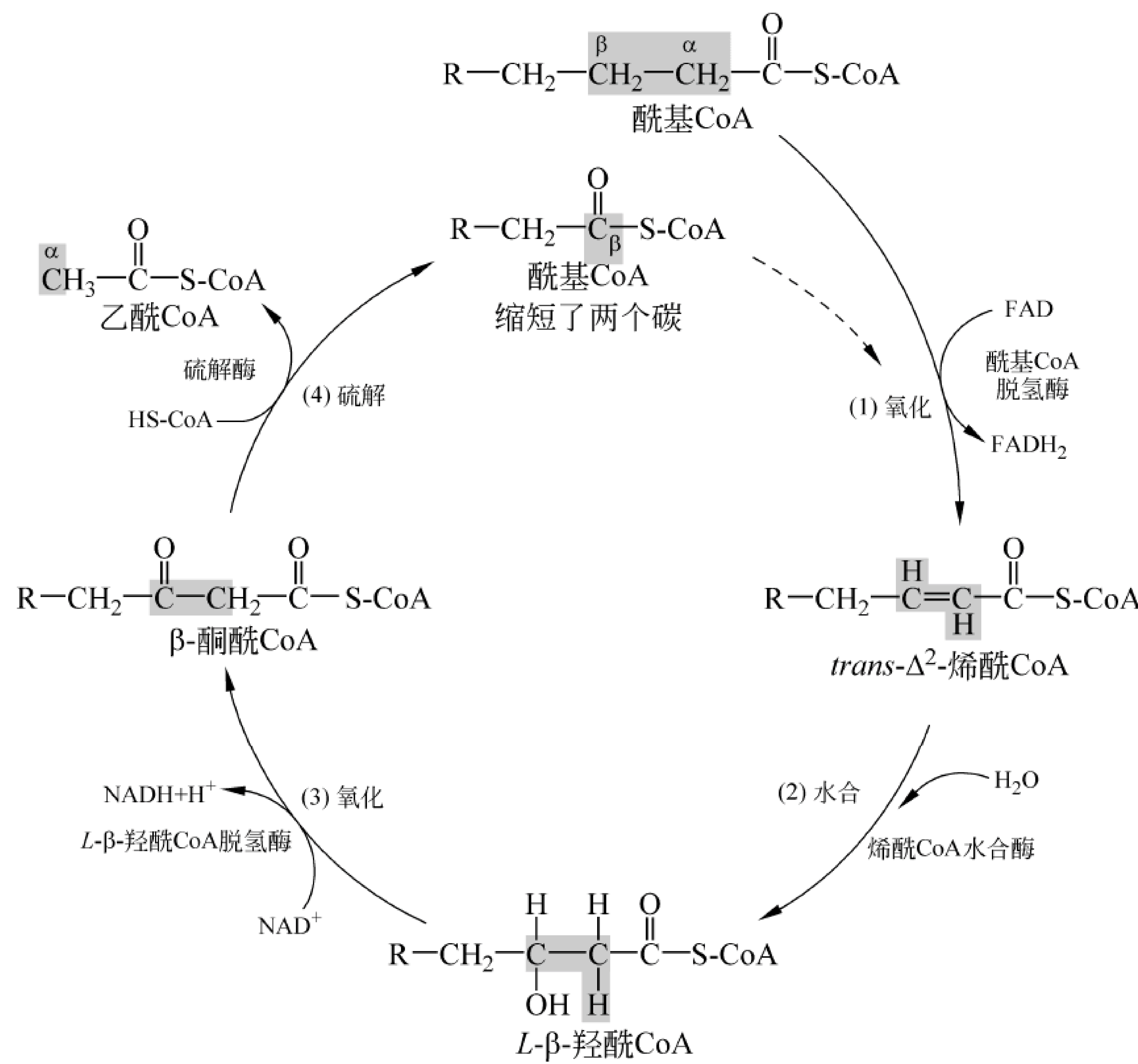


图18.5 脂肪酸β-氧化

一轮β-氧化后,生成1分子乙酰CoA和缩短了两个碳的酰基CoA,同时分别生成1分子 $FADH_2$ 和1分子 $NADH+H^+$

以下按照图18.5中反应序号描述各步反应。

(1) 氧化

在酰基CoA脱氢酶(acyl CoA dehydrogenase)(FAD作为辅基)催化下酰基CoA脱氢,在α碳和β碳之间形成双键,生成*trans*-Δ^2-烯酰CoA,同时使FAD还原为 $FADH_2$。$FADH_2$ 将电子经ETF(electrontransferring flavoprotein,电子转移黄素蛋白)传给ETF:泛醌氧化还原酶(ubiquinone oxidoreductase),最后转给辅酶Q,生成 QH_2。来自 QH_2 的电子进入电子传递链。

(2) 水合

在烯酰 CoA 水合酶(enoyl CoA hydratase)催化下，在反-Δ^2-烯酰 CoA 的 α 碳和 β 碳之间双键处加水，因催化立体特异性，只生成 *L*-β-羟酰 CoA。

(3) 氧化

在 L-β-羟酰 CoA 脱氢酶(*L*-β-hydroxyacyl CoA dehydrogenase)(NAD^+ 作为辅酶)催化下，*L*-β-羟酰 CoA 的 β 碳上两个氢被脱去，生成 β-酮酰 CoA，NAD^+ 被还原为 NADH 和 H^+。

(4) 硫解

β-氧化的最后一步反应是在 β-酮酰 CoA 硫解酶，简称硫解酶(thiolase)催化下，切断 β-酮酰 CoA 的 β 碳右侧键，生成 1 分子乙酰 CoA 和比起始酰基 CoA 少了两个 C 的酰基 CoA。

通过上述反应，脂肪酸的 β 碳由亚甲基(CH_2)的还原型碳变成了羰基(CO)中的氧化型碳，这也是将脂肪酸氧化称之为 β-氧化的缘故。减少了两个 C 的酰基 CoA 再作为底物重复上述(1)～(4)反应，直至整个酰基 CoA 都降解为乙酰 CoA。

以十六碳棕榈酸为例，经 β-氧化后的总反应为：



$$\text{棕榈酰 CoA} + 7Q + 7NAD^+ + 7H_2O + 7CoASH \longrightarrow 8\ \text{乙酰 CoA} + 7QH_2 + 7NADH + 7H^+$$

生成的乙酰 CoA 进入柠檬酸循环，而且 β-氧化和柠檬酸循环生成的所有 NADH 和 QH_2 都经呼吸链氧化(图 18.6)。

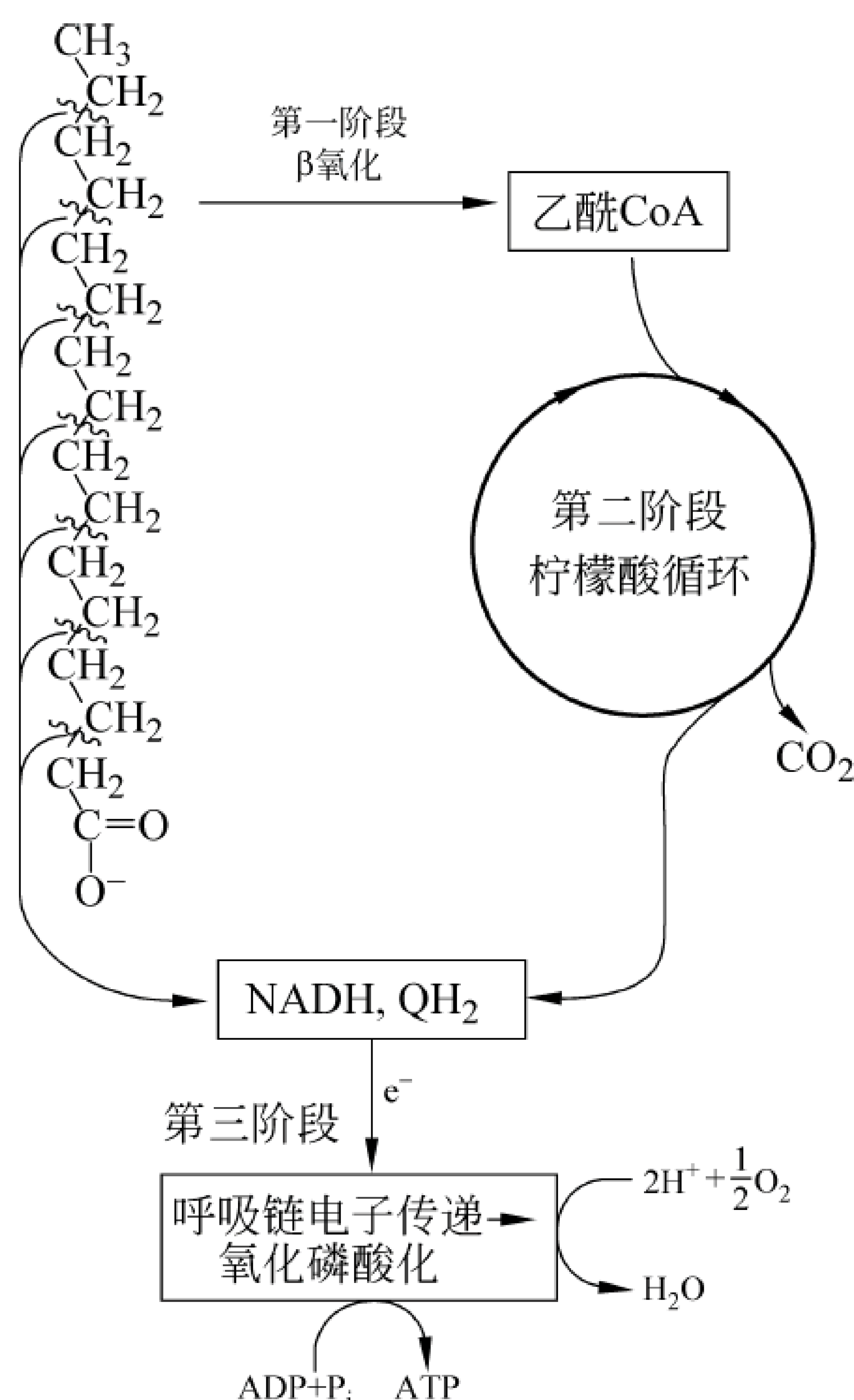


图 18.6　棕榈酸彻底氧化为 CO_2 和 H_2O 的 3 个阶段

从图18.6可以清楚地看出脂肪酸彻底氧化为CO_2和H_2O经历的3个阶段：第一阶段，长链脂肪酸经β-氧化降解为乙酰基(乙酰CoA)；第二阶段，乙酰基经柠檬酸循环氧化为CO_2；第三阶段，前面两个阶段产生的NADH和QH_2中的电子经呼吸链传递给O_2，传递中产生的能量经氧化磷酸化合成ATP。

18.2.3 脂肪酸氧化产生的能量

以棕榈酸为例，看看1分子棕榈酸经过β-氧化、柠檬酸循环和电子传递氧化磷酸化3个阶段共产生多少能量。1分子棕榈酰CoA经β-氧化共生成8个乙酰CoA、7分子QH_2和7分子$NADH+H^+$。由于β-氧化发生在线粒体内，还原型辅酶直接进入电子传递链。经电子传递和氧化磷酸化1分子的$NADH+H^+$氧化生成2.5分子ATP，1分子QH_2氧化产生1.5分子ATP。

另外每个乙酰CoA经柠檬酸循环、电子传递和氧化磷酸化可以生成10ATP(3分子NADH与H^+、1分子QH_2、1分子GTP)。所以1分子的棕榈酰CoA经β-氧化、柠檬酸循环和电子传递完全氧化产生的能量为：

$$7QH_2(7\times1.5)+7NADH+H^+(7\times2.5)+8\text{ 乙酰 }CoA(8\times10)=108ATP$$

假如要计算胞质溶胶中1分子棕榈酸经β-氧化生成的ATP，还应考虑脂肪酸活化时消耗的两个高能磷酸键，即相当于消耗2个ATP，所以1分子棕榈酸完全氧化可净生成106个ATP。

将葡萄糖氧化与脂肪酸的氧化产生的能量作一比较，1分子葡萄糖氧化成CO_2和水可以产生30(或32)分子ATP，不过葡萄糖分子只含有6个碳，如果是16个碳应当生成(16/6)×30(或32)=80(85.3)ATP，产生的ATP只是16碳棕榈酸经β-氧化生成能量的74%(或78%)。所以，脂肪酸中的1个碳的氧化要比糖中的1个碳提供更多的能量，这主要是因为糖中的碳已经被部分氧化了。更为重要的是作为燃料分子，脂肪的疏水性使得它能够大量被储存，而不需要像糖那样结合大量水(为了储存1g糖原，至少要带上1g水)。无水储存使得单位质量中储存的能量更多。

当以脂肪作为能源时，生物体还能获得大量的水，因为脂肪氧化时可以生成许多水。骆驼的驼峰是个储存脂的“仓库”，它既可以提供能量，又能够提供骆驼所需要的水，所以骆驼即使一段时间内不饮水也能走很长距离的路。

既然以脂的形式储存能量有显著的优越性，人们要问，为什么还要以糖原的形式储存能量呢？这主要由于糖和脂肪酸的代谢之间有很大的差别，最重要的一点是脂肪酸氧化时需要氧才能产生可利用的能量，在缺氧条件下，不能提供任何能量。而糖是惟一能在缺氧条件下产生能量的化合物。由于膜的特殊性，中枢神经系统不能拥有大量的脂肪酸，也就是说，不能利用这些底物去生产大量的能量。因此，在通常环境下，尽管中枢神经系统不是厌氧组织，而是嗜氧组织，但它还是要依赖葡萄糖的氧化提供能量。

18.3 奇数碳脂肪酸的氧化

自然界中发现的大多数脂肪酸是偶数碳脂肪酸，但在许多植物、海洋生物和石油酵母等生物体内还存在很多奇数碳脂肪酸。奇数碳脂肪酸也像偶数碳脂肪酸一样也能够进行β-氧

化，但最后一轮 β-氧化的硫解反应产物中除了乙酰 CoA 外，还有丙酰 CoA。在哺乳动物肝脏中丙酰 CoA 经 3 个酶催化可转化为琥珀酰 CoA（图 18.7）。

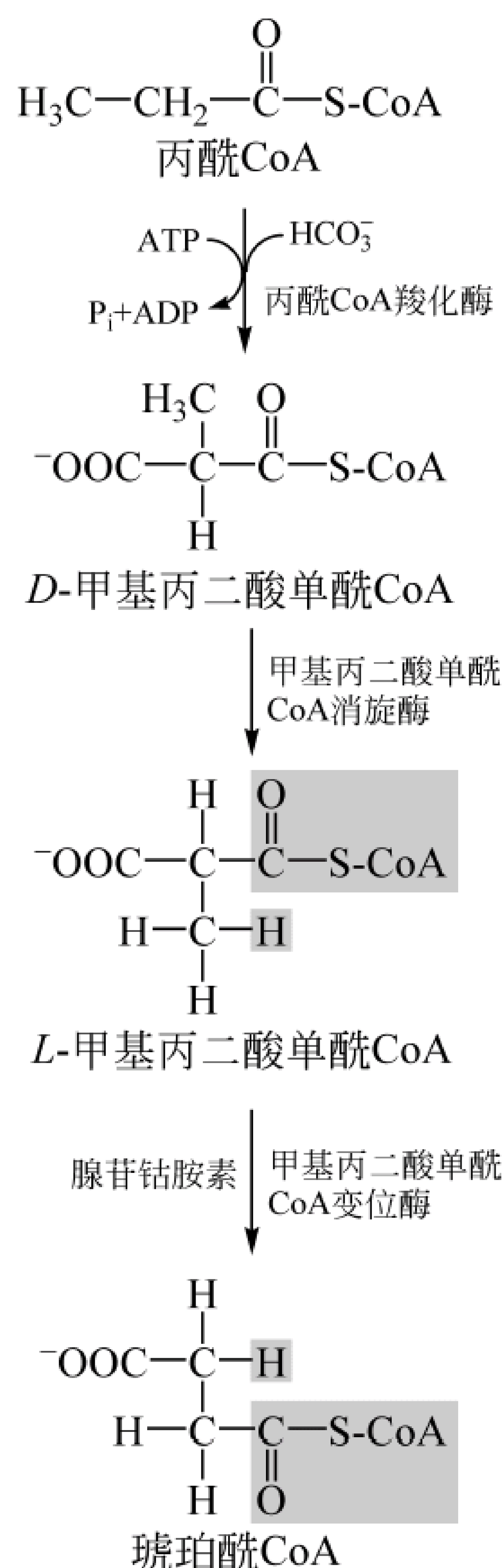


图 18.7 丙酰 CoA 转化为琥珀酰 CoA

首先在丙酰 CoA 羧化酶（propionyl-CoA carboxylase）（生物素作为辅基）催化下丙酰 CoA 结合 HCO_3^- 形成 *D*-甲基丙二酸单酰 CoA，然后经甲基丙二酸单酰 CoA 消旋酶（methylmalonyl-CoA racemase）催化转化为它的 *L*-异构体，最后在甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶（methylmalonyl-CoA mutase）（脱氧腺苷钴胺素作为辅酶）催化下形成琥珀酰 CoA。

生成的琥珀酰 CoA 又可转换成草酰乙酸，由于草酰乙酸可用作糖异生的底物，因此来自奇数碳脂肪酸的丙酰基可以净转化为葡萄糖。在没有乙醛酸循环的生物体中，糖可以转化为脂肪酸，但脂肪酸是不能转化为糖的，就是说脂肪酸氧化生成的乙酰 CoA 不能净合成糖，而以丙酰 CoA 作为起始物质的糖异生却是个例外。

18.4 不饱和脂肪酸的氧化

上面描述的饱和偶数碳脂肪酸的 β-氧化是典型的脂肪酸氧化过程。然而在动物和植物内的三酰甘油以及磷脂中的很多脂肪酸都是不饱和脂肪酸（含一个或多个双键），而且这些双键都是顺式（*cis*）构型，不是烯酰 CoA 水合酶的底物。因此要使反应继续进行还需要另外 2

个酶：Δ^3,Δ^2-烯酰 CoA 异构酶和 Δ^4,Δ^2-二烯酰 CoA 还原酶。下面以亚油酸氧化为例说明。

亚油酸是十八碳二烯酸(含两个双键)，具有 *cis*，cis-$\Delta^{9,12}$ 构型。亚油酸首先在胞质溶胶中激活形成亚油酰 CoA，然后经肉碱转运系统转运到线粒体内被氧化(图 18.8)。

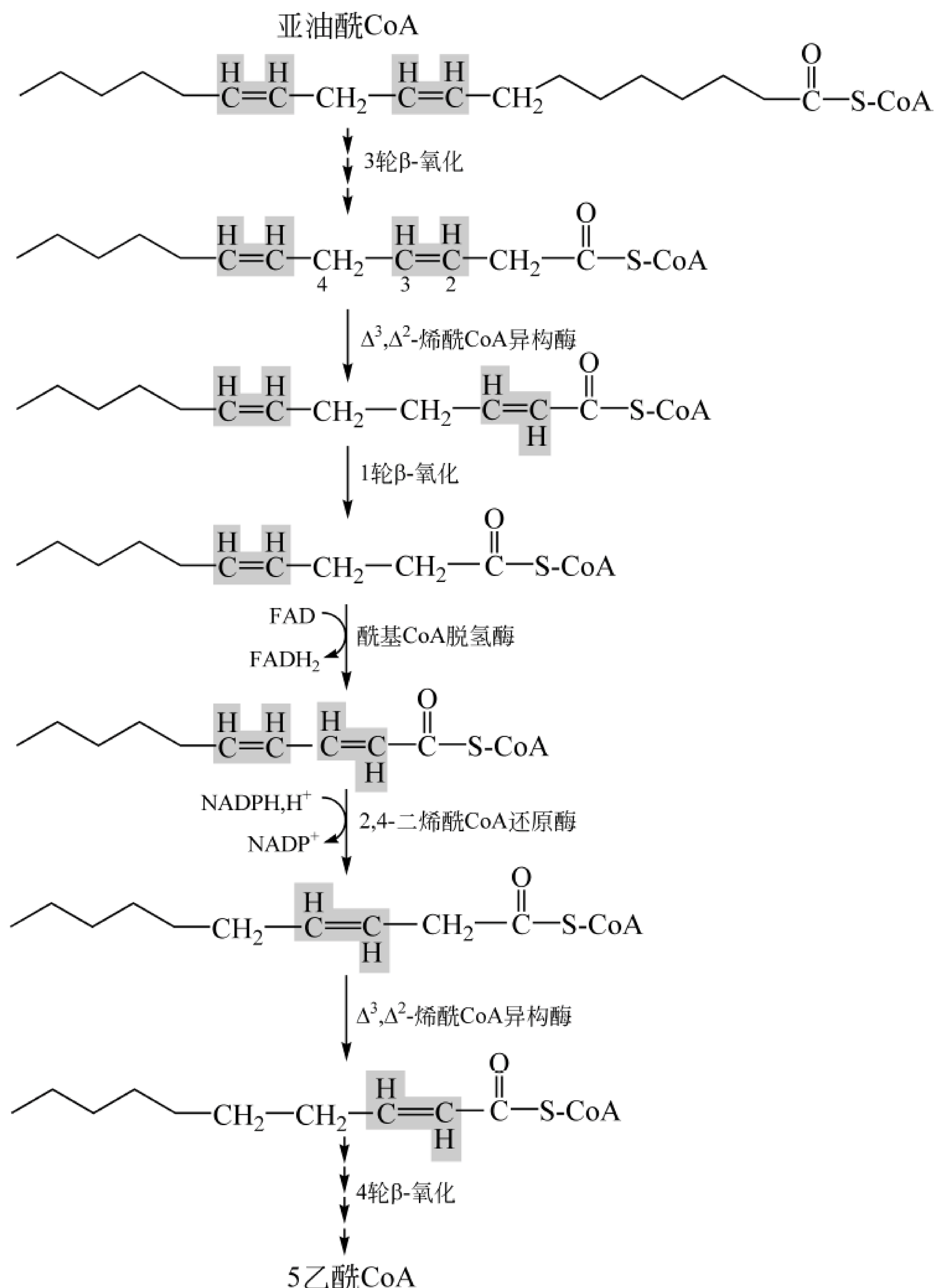


图 18.8　亚油酰 CoA 的氧化过程

首先进行三轮 β-氧化过程，生成 *cis*,*cis*-$\Delta^{3,6}$-十二烯酰 CoA，后者经 Δ^3,Δ^2-烯酰 CoA 异构酶催化生成 *trans*-Δ^2，*cis*-Δ^6-十二烯酰 CoA。接着经一轮 β-氧化后生成 *cis*-Δ^4-十烯酰 CoA，然后经过酰基 CoA 脱氢酶催化生成 *trans*-Δ^2，*cis*-Δ^4-十烯酰 CoA，随后在特殊还原酶 2,4-二烯酰 CoA 还原酶(2,4-dienoyl CoA reductase)催化下生成 *trans*-Δ^3-十烯酰 CoA，再经 Δ^3,Δ^2-烯酰 CoA 异构酶作用，重新进入正常的 β-氧化过程。结果 1 分子亚油酰 CoA 降解为 9 分子乙酰 CoA。

18.5　α-氧化和 ω-氧化

脂肪酸分解代谢除了最主要的 β-氧化途径外，还存在着 α-氧化和 ω-氧化途径。

1. α-氧化

植醇(phytol)也称为叶绿醇，是带有支链的叶绿素降解产物，存在于羊和牛等反刍动物的脂肪以及奶制品中。反刍动物可以将植醇氧化成带有支链的植烷酸(phytanic acid)，但进入人体内的植烷酸不能通过β-氧化降解，因为支链甲基位于奇数碳上。此时需要在过氧化物酶体中通过α-氧化使α碳原子氧化，然后再进行常规β-氧化(图18.9)。

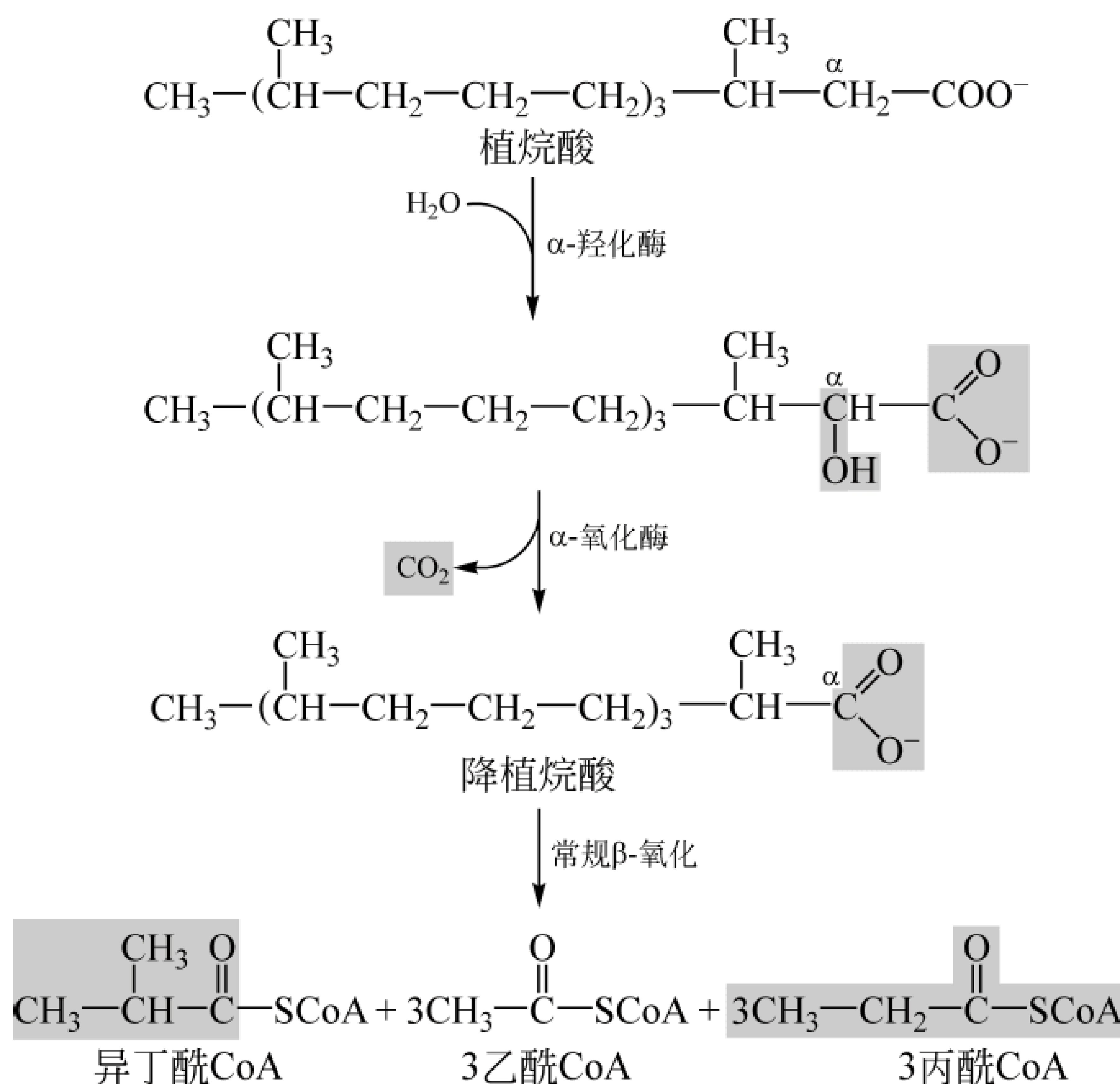


图 18.9　脂肪酸 α-氧化

α-氧化，植烷酸氧化后的产物降植烷酸可进行常规β-氧化

就像图18.9表示的那样，植烷酸经α-羟化酶和α-氧化酶依次羟化和脱羧，生成降植烷酸，α碳由还原型变为氧化型。然后降植烷酸经酰基CoA合成酶激活形成降植烷酰CoA后，就可进行常规β-氧化。患有Refsum病的人缺乏α-氧化系统，食用奶制品会导致体内植烷酸积累，引发周围神经炎类型的运动失调和视网膜炎。

2. ω-氧化

ω-氧化是另一种有别于β-氧化的脂肪酸分解代谢途径，主要存在于脊椎动物的肝和肾内质网中，该途径主要是降解10个或12个碳原子的脂肪酸。在依赖于细胞色素 P_{450} 的单加氧酶(monooxygenase)(NADPH为辅酶)催化下，在脂肪酸的ω碳(末端碳)加上—OH，然后经醇脱氢酶和醛脱氢酶依次催化生成一个两端都带有羧基的二羧酸，激活后每一端接上CoA后再进入线粒体，双羧基末端按照常规的β-氧化途径进行氧化，产物除乙酰CoA外，还会有少量的琥珀酸或己二酸那样的二羧酸产物(图18.10)。

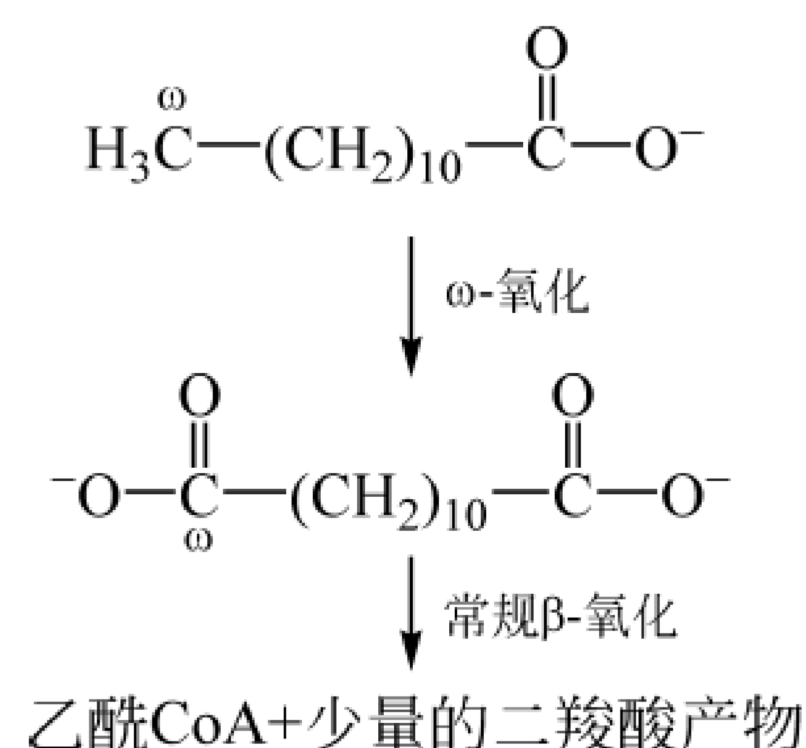


图 18.10　脂肪酸 ω-氧化

18.6 酮体

脂肪酸氧化产生的乙酰 CoA 大部分进入柠檬酸循环,然而还有一部分乙酰 CoA 在肝线粒体中经生酮作用(ketogenesis)被转化为酮体(ketone bodies)。所谓"酮体"指的是 β-羟丁酸、乙酰乙酸和丙酮,β-羟丁酸和乙酰乙酸的量比较大,而丙酮的量很小。

酮体是燃料分子,作为"水溶性脂"在有些器官,例如心脏和肾中比脂肪酸氧化得更快。尤其是在饥饿期间,酮体在肝中大量生成,使血液中酮体量大大增加,除作为其他组织的燃料外,还取代葡萄糖作为脑细胞的主要燃料(正常情况下,脂肪酸不能透过血-脑屏障)。

18.6.1 酮体合成

在哺乳动物中,酮体在肝细胞线粒体的基质中合成(图 18.11)。首先,两分子乙酰 CoA 经硫解酶(也称为乙酰 CoA 酰基转移酶)催化缩合形成乙酰乙酰 CoA,然后在 HMG-CoA 合酶(HMG-CoA synthase)催化下再与第三个乙酰 CoA 分子结合,形成 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰 CoA(3-hydroxy-3-methylglutrylCoA,HMG-CoA)。

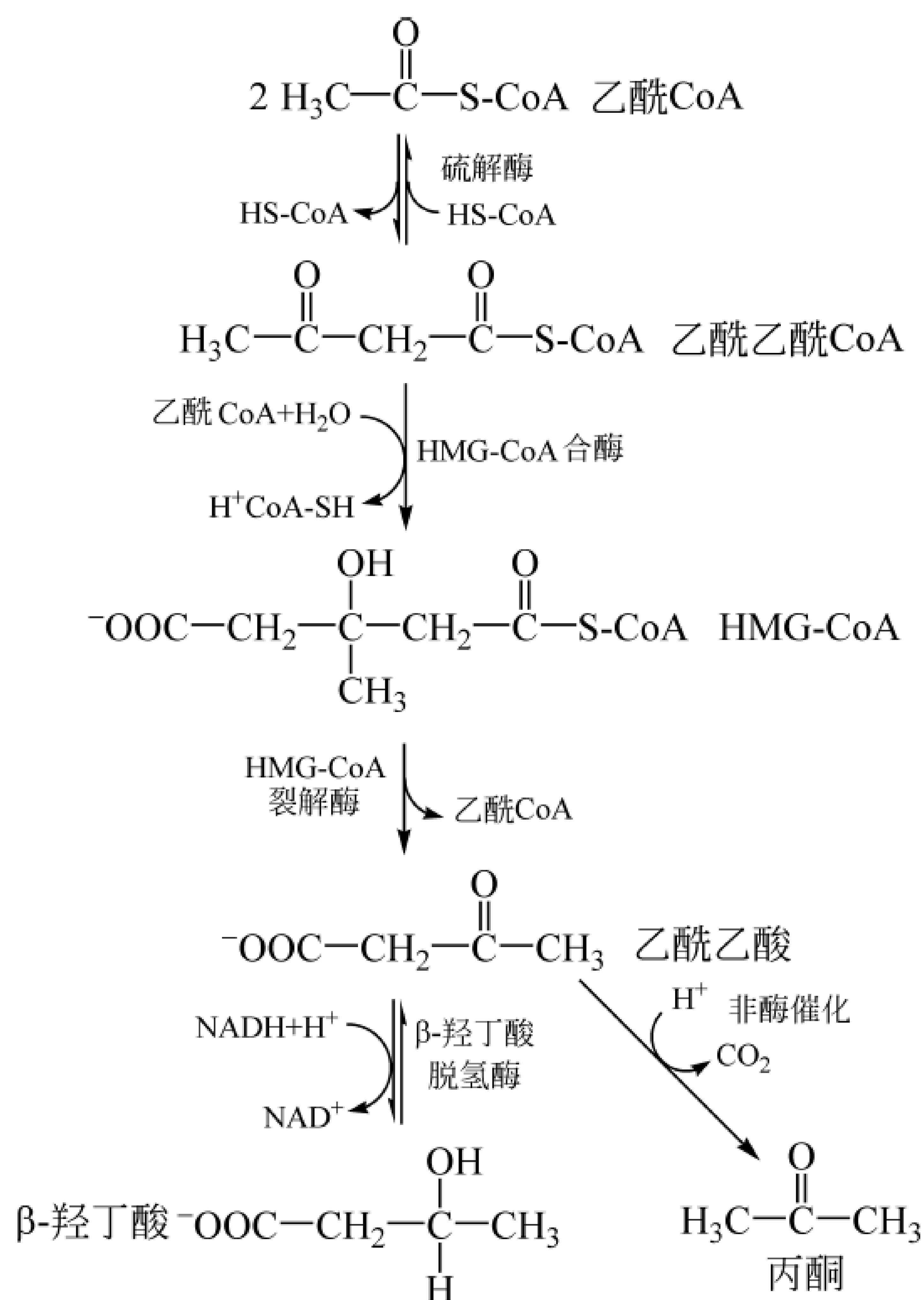


图 18.11 酮体合成

接下来 HMG-CoA 被 HMG-CoA 裂解酶(HMG-CoA lyase)裂解,生成乙酰乙酸和乙酰 CoA。乙酰乙酸在 β-羟丁酸脱氢酶(β-hydroxybutyrate dehydrogenase)催化下生成 β-羟丁酸,反应是可逆的。乙酰乙酸和 β-羟丁酸都可以被转运出线粒体内膜和肝细胞质膜,进入

血液后被其他细胞用作燃料。在血液中少量的乙酰乙酸可自发脱羧生成丙酮。

18.6.2 酮体氧化

在用β-羟丁酸和乙酰乙酸作燃料的细胞中，它们都可进入线粒体。在线粒体中β-羟丁酸重新生成乙酰乙酸。在琥珀酰CoA转移酶(succinyl CoA transferase)，也称为β-酮酰CoA转移酶(β-ketoacyl coA transferase)催化下乙酰乙酸与琥珀酰CoA反应形成乙酰乙酰CoA。最后在硫解酶的作用下乙酰乙酰CoA转化为2分子乙酰CoA，进入柠檬酸循环氧化(图18.12)。

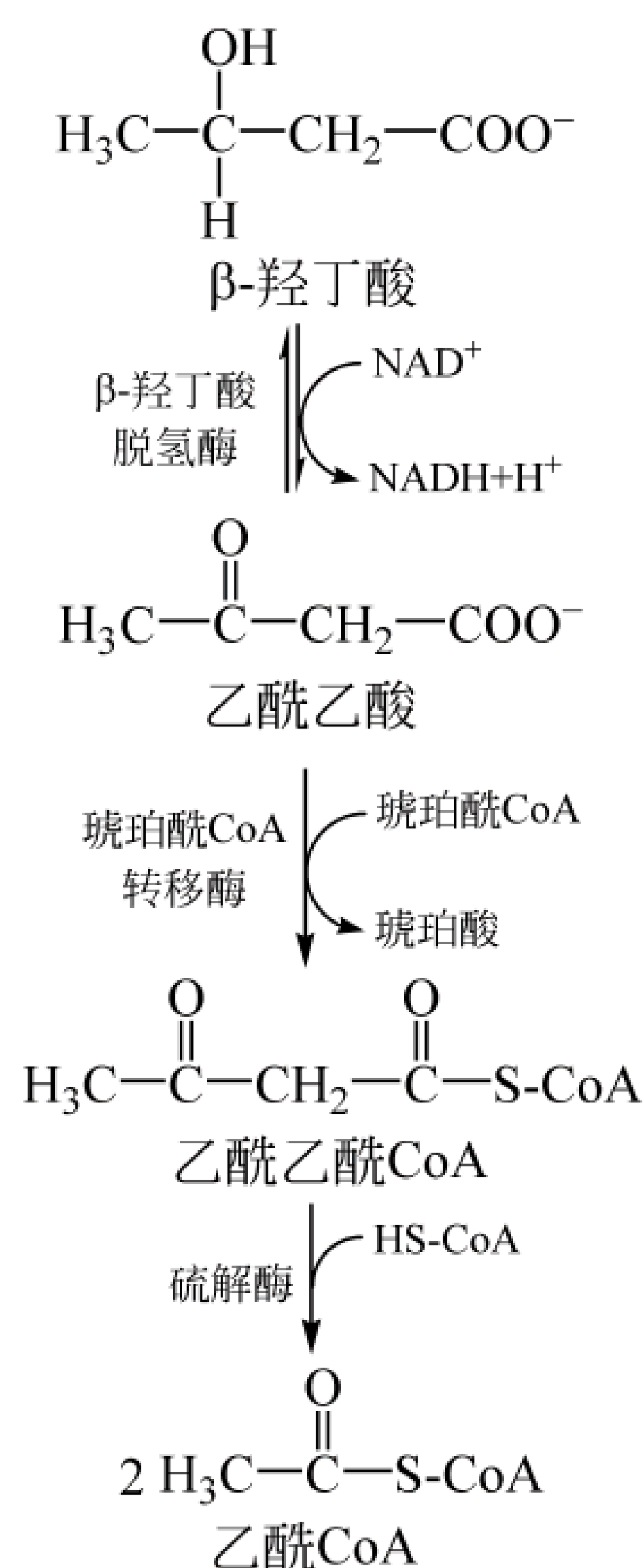


图 18.12 酮体氧化

酮体是很多组织的重要能源，包括中枢神经系统，但肝和红细胞除外，因为红细胞中没有线粒体，而肝中缺少激活酮体的酶。心肌和肾优先利用乙酰乙酸。脑在正常代谢时主要以葡萄糖作燃料，但在饥饿和患糖尿病时脑也不得不利用乙酰乙酸，长期饥饿时，脑需要的燃料中有75%是乙酰乙酸。

酮体是正常的、有用的代谢物。但当酮体的浓度过量时，会产生比较严重的后果。长期饥饿或患糖尿病的人，血液中的酮体水平是正常时的40多倍，呼吸中伴有丙酮的气味。酮体浓度高，称为酮病(ketosis)，会引起体内一系列生理变化。由于乙酰乙酸、*D*-β-羟丁酸都是酸，可使体内酸碱平衡紊乱，出现酮酸中毒(ketoacidosis)。

18.7 脂肪酸的生物合成

细菌、真菌、植物和动物中脂肪酸的生物合成非常相似，由于细菌和植物中催化脂肪酸合成的酶都是相对独立，而且纯化容易，所以这些生物的脂肪酸合成途径首先被阐明。植物的脂肪酸合成发生在叶绿体的基质中，而动物的脂肪酸合成主要发生在肝细胞和脂肪组织细胞的胞质溶胶中。在特殊条件下，例如泌乳期的乳腺细胞也可合成少量的脂肪酸。真核生物脂肪酸生物合成包括3个阶段：乙酰CoA由线粒体转运到胞质溶胶；乙酰CoA羧化生成丙二酸单酰CoA；脂肪酸合酶复合物催化脂肪酸合成。

18.7.1 乙酰CoA的转运

脂肪酸合成开始于乙酰CoA，需要的乙酰CoA经柠檬酸转运系统(citrate transport system)由线粒体转运到胞质溶胶(图18.13)。

首先，在柠檬酸合酶催化下乙酰CoA和草酰乙酸缩合形成柠檬酸，然后由线粒体转运到胞质溶胶。在柠檬酸裂解酶(citrate lyase)催化下柠檬酸重新生成乙酰CoA和草酰乙酸，反应需要ATP和CoA-SH。

胞质溶胶中苹果酸脱氢酶催化草酰乙酸还原为苹果酸，同时NADH氧化为NAD^+。然后苹果酸在苹果酸酶(malic enzyme)催化下脱羧生成丙酮酸，同时$NADP^+$还原为

NADPH。新生成的丙酮酸经转运进入线粒体,羧化形成草酰乙酸开始下一轮穿梭转运循环。

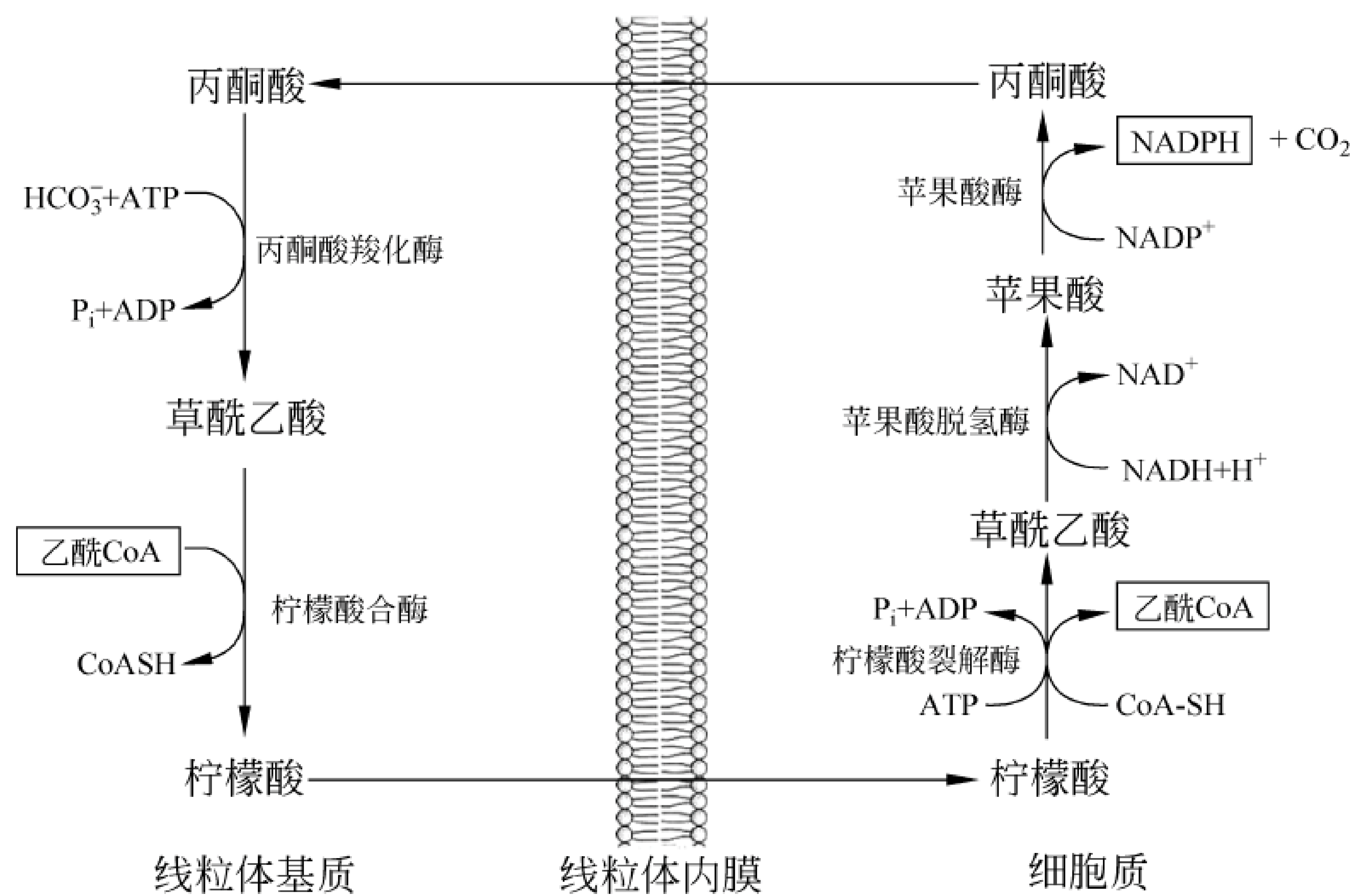


图 18.13 柠檬酸转运系统

柠檬酸转运系统不只是将乙酰 CoA 由线粒体转运到胞质溶胶,而且还将 NADH 转换成了可用于脂肪酸合成的 NADPH。

18.7.2 丙二酸单酰 CoA 的合成

由线粒体转运到胞质溶胶的乙酰 CoA 在乙酰 CoA 羧化酶(acetyl CoA carboxylase, ACC)催化下羧化形成丙二酸单酰 CoA。首先,HCO_3^- 在 ATP 参与下与生物素形成羧基生物素。然后,激活的 CO_2 被转移给乙酰 CoA,形成丙二酸单酰 CoA(图 18.14)。

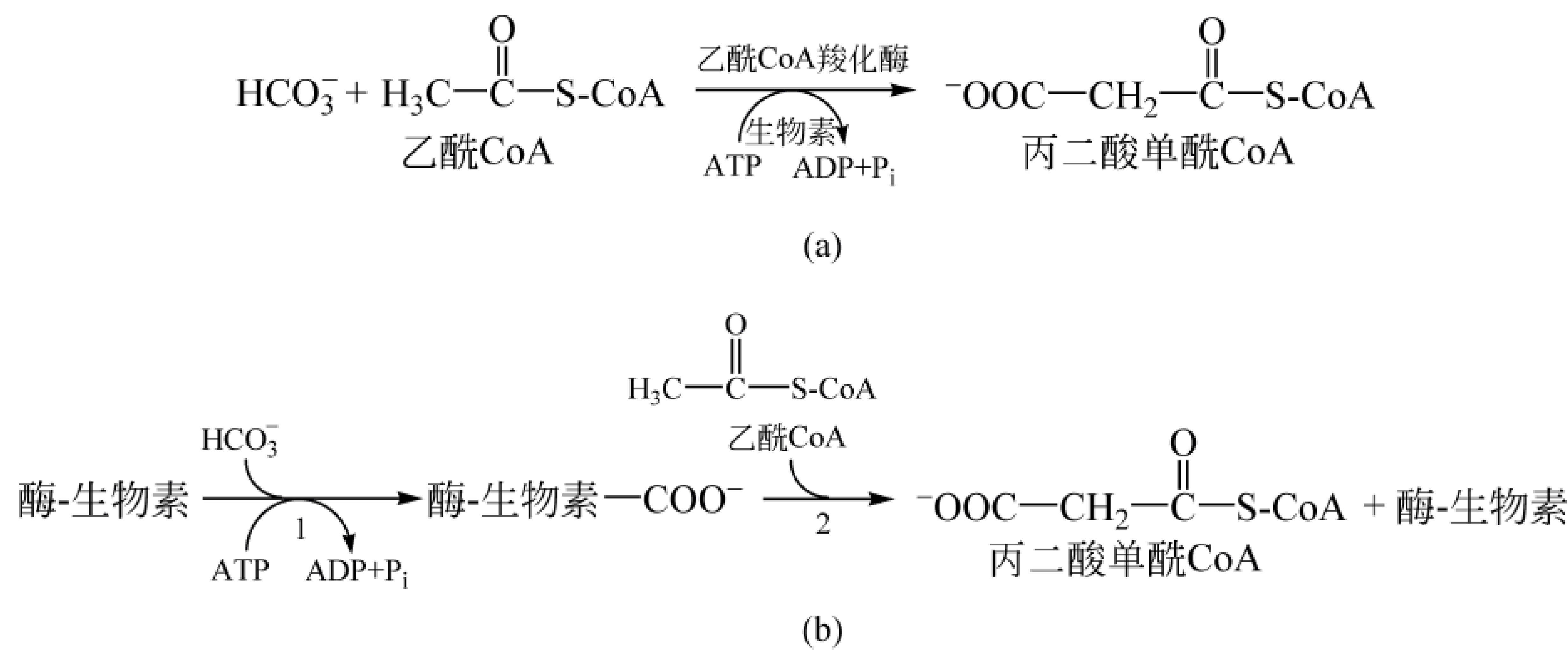


图 18.14 丙二酸单酰 CoA 的合成

(a) 乙酰 CoA 羧化酶催化的总反应;(b) 乙酰 CoA 羧化酶催化的反应机制,1. 生物素羧化酶活性,2. 转羧酶活性

在 *E. coli* 中乙酰 CoA 羧化酶由称为生物素载体蛋白、生物素羧化酶和转羧酶的 3 个不同亚基组成;而在动物和酵母中,单一的一条多肽链中包含着这 3 个活性部位。

18.7.3 脂肪酸的合成

脂肪酸合成也需要酰基载体，但这个载体不是 CoA，而是一个也带有辅基磷酸泛酰巯基乙胺的酰基载体蛋白(acyl carrier protein，ACP)(图 18.15)。

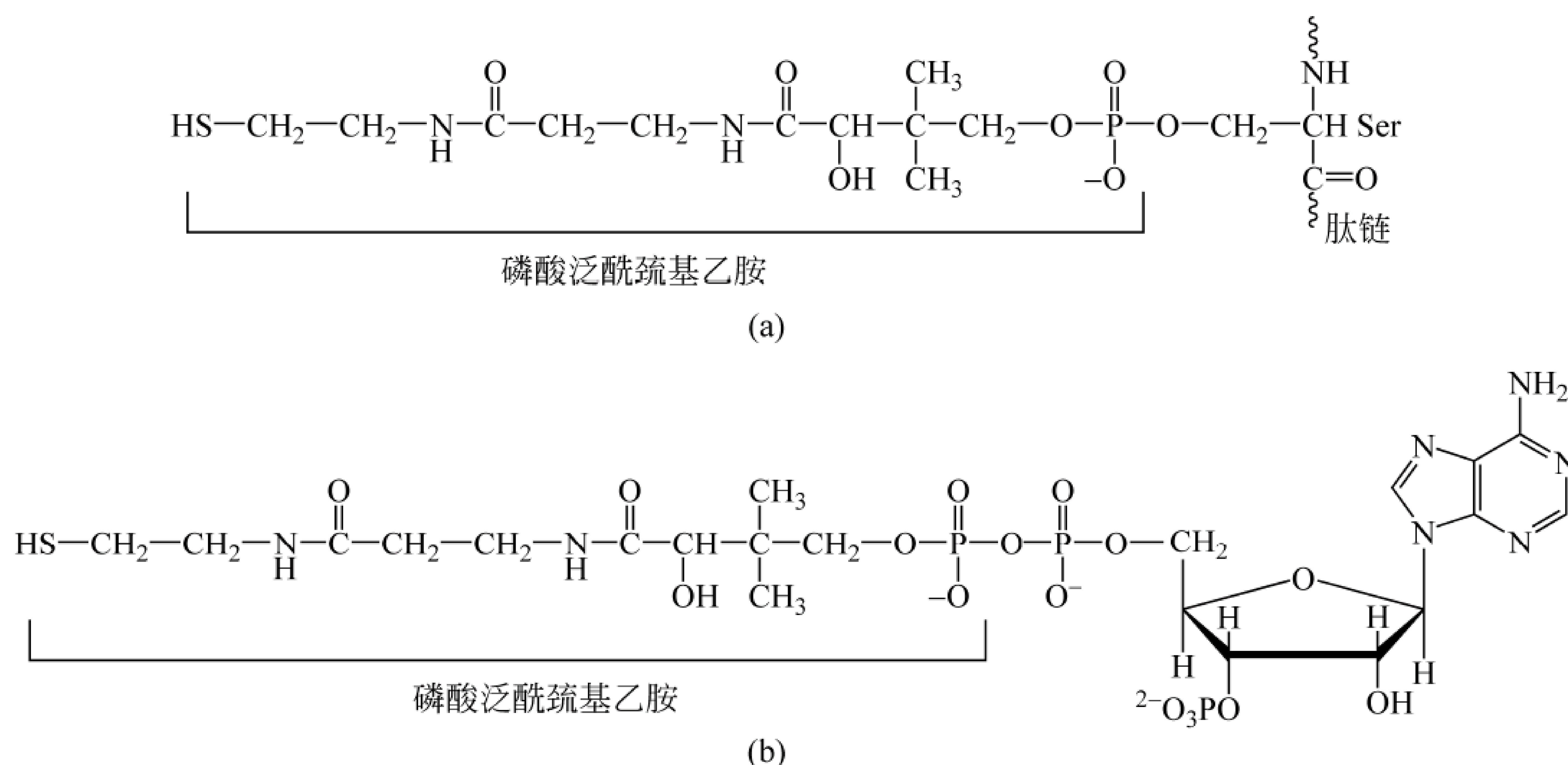


图 18.15 酰基载体蛋白

(a) ACP；(b) CoA。脂肪酸通过磷酸泛酰巯基乙胺的巯基与 ACP 和 CoA 相连

E. coli 中脂肪酸合成除了需要上述 ACP 以外，还需要由 7 个独立的酶组成的脂肪酸合酶复合物(fatty acid synthase complex)。而在哺乳动物中，一条多肽链包含了脂肪酸合成所需要的所有酶的催化活性，以二聚体形式存在，是一种多功能蛋白质。虽然脂肪酸合酶结构不同，但哺乳动物中脂肪酸合成过程与 *E. coli* 中脂肪酸合成的过程非常相似。

E. coli 中脂肪酸合成包括 5 个反应步骤：负载、缩合、还原、脱水和还原。整个反应过程和次序如图 18.16 所示。重复上述缩合、还原、脱水和还原反应过程，直至长链脂肪酸合成完成。

下面按照图 18.16 所示的反应次序进一步加以说明。

(1) 负载

在乙酰 CoA-ACP 转酰基酶(acetyl-CoA-ACP transacylase)催化下，乙酰 CoA 中乙酰基被转移到 ACP 上，生成乙酰-ACP，然后乙酰-ACP 中的乙酰基再转移到 β-酮酰-ACP 合酶上。在丙二酸单酰 CoA-ACP 转酰基酶(malonyl-CoA-ACP transacylase)催化下，丙二酸单酰基被转移到 ACP 上，生成丙二酸单酰-ACP。

(2) 缩合

在 β-酮酰-ACP 合酶(β-ketoacyl-ACP synthase)催化下，连接在酶上的乙酰基转移到丙二酸单酰-ACP 上，形成乙酰乙酰-ACP，并释放出 1 分子 CO_2。核素实验证明，脱下的 CO_2 来自前面丙二酸单酰 CoA 合成时的底物 HCO_3^-。

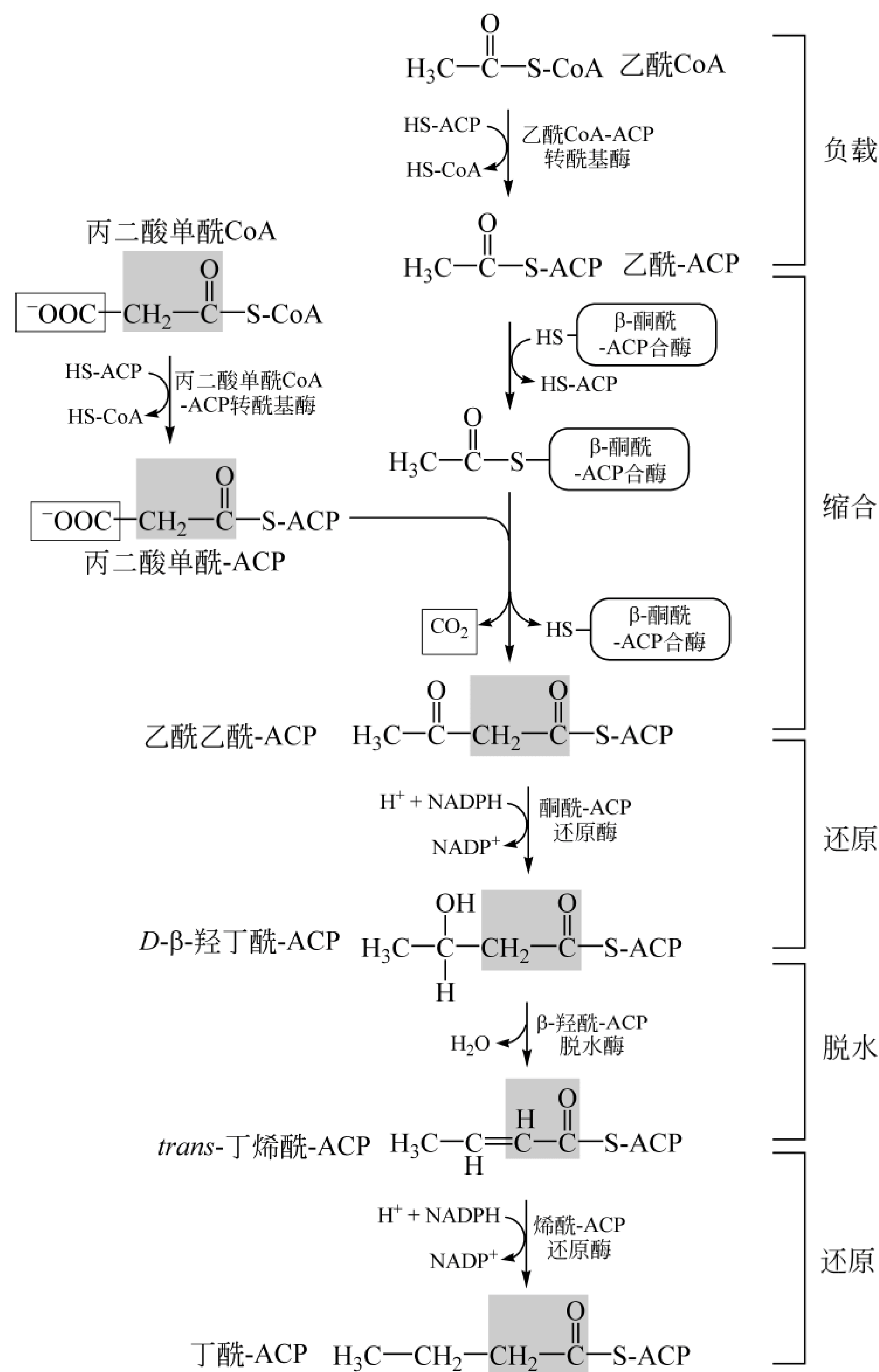


图 18.16　*E. coli* 中丁酰-ACP 的合成

(3) 还原

在 β-酮酰-ACP 还原酶(β-ketoacyl-ACP reductase)催化下，乙酰乙酰-ACP 的 β-羰基被还原为 β-羟基，形成 *D*-β-羟丁酰-ACP。

(4) 脱水

在 β-羟丁酰-ACP 脱水酶(β-ketoacyl-ACP dehydratase)催化下，*D*-β-羟丁酰-ACP 脱水生成带有双键的 *trans*-丁烯酰-ACP。

(5) 还原

在 β-烯酰-ACP 还原酶(β-enoy-ACP reductase)催化下，*trans*-丁烯酰-ACP 被还原为丁

酰-ACP。至此，由 1 分子乙酰-ACP 接上一个二碳单位，生成了一个四碳的丁酰-ACP。

重复上述(2)～(5)的合成过程，但起始底物是已经加长了两个碳的丁酰-ACP，而不是乙酰-ACP，以后每一轮链的延伸都有一个新的丙二酸单酰-ACP 分子参与合成(图 18.17)。

要注意的是，在第一轮缩合反应中，乙酰-ACP 贡献的两个碳变成了生长着的酰基分子的末端的两个碳，但从第二轮(从丁酰-ACP 开始)起，只有丙二酸单酰-ACP 贡献二碳单位。依次重复进行缩合、还原、脱水、还原，直至持续到生成棕榈酰-ACP。棕榈酰-ACP 在硫酯酶(thioesterase)催化下生成棕榈酸和 HS-ACP。

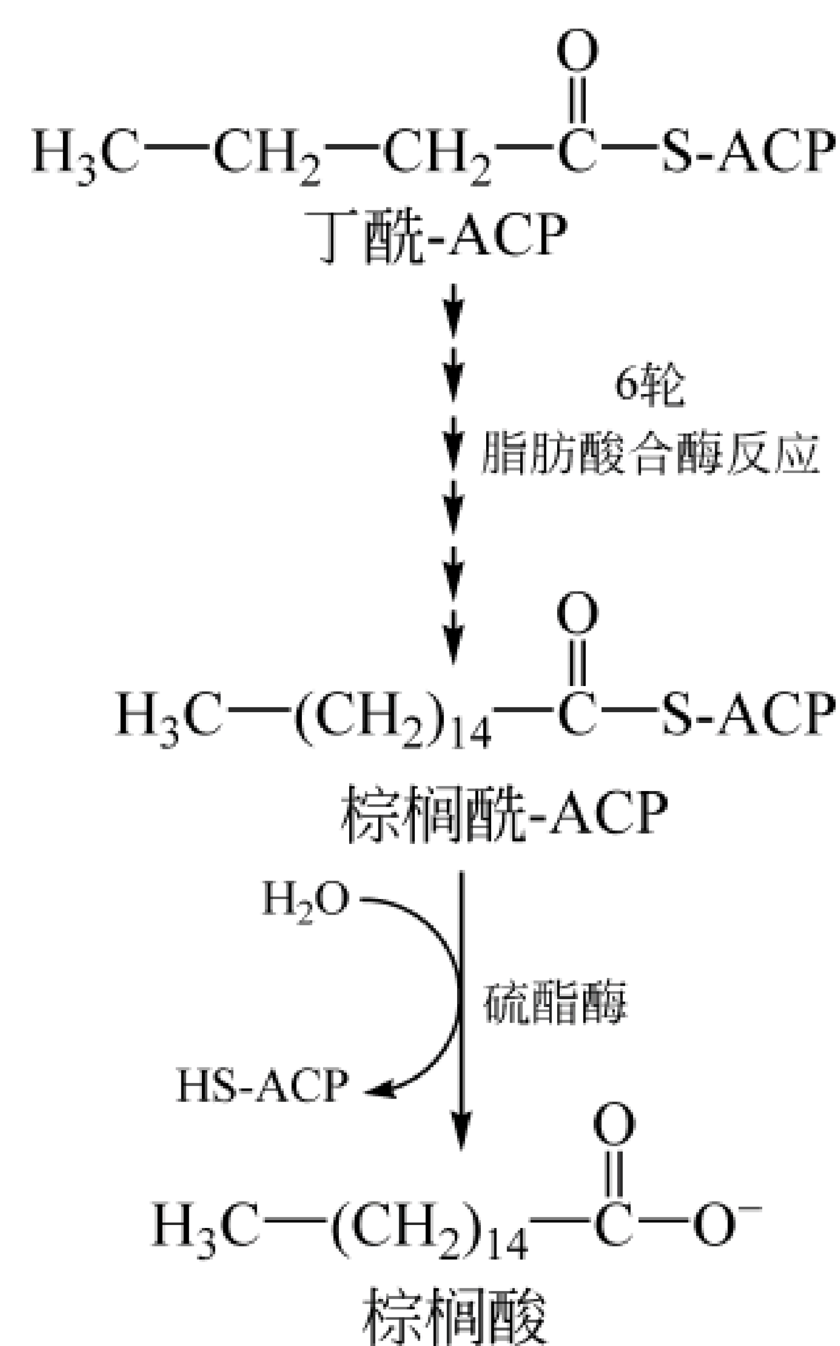


图 18.17　棕榈酸合成
从丁酰-ACP 开始

由乙酰 CoA 和丙二酸单酰 CoA 合成棕榈酸的总反应为：




$$\text{乙酰 CoA} + 7\ \text{丙二酸单酰 CoA} + 14NADPH + 14H^+ \longrightarrow \text{棕榈酸} + 7CO_2 + 14NADP^+ + 8HS\text{-}CoA + 6H_2O$$

7 分子丙二酸单酰-CoA 形成需要 7 分子乙酰 CoA：



$$7\ \text{乙酰 CoA} + 7CO_2^- + 7ATP \longrightarrow 7\ \text{丙二酸单酰 CoA} + 7ADP + 7P_i$$

因此由乙酰 CoA 合成棕榈酸的总反应应为：




$$8\ \text{乙酰 CoA} + 7ATP + 14NADPH + 14H^+ \longrightarrow \text{棕榈酸} + 14NADP^+ + 8\ HS\text{-}CoA + 7ADP + 7P_i + 6H_2O$$

18.7.4　脂肪酸合成与β-氧化

图 18.18 给出了脂肪酸合成和脂肪酸 β-氧化两条代谢途径。脂肪酸合成每一轮都涉及碳-碳键形成的缩合反应，紧接着的还原、脱水和还原反应步骤。而在脂肪酸 β-氧化的降解

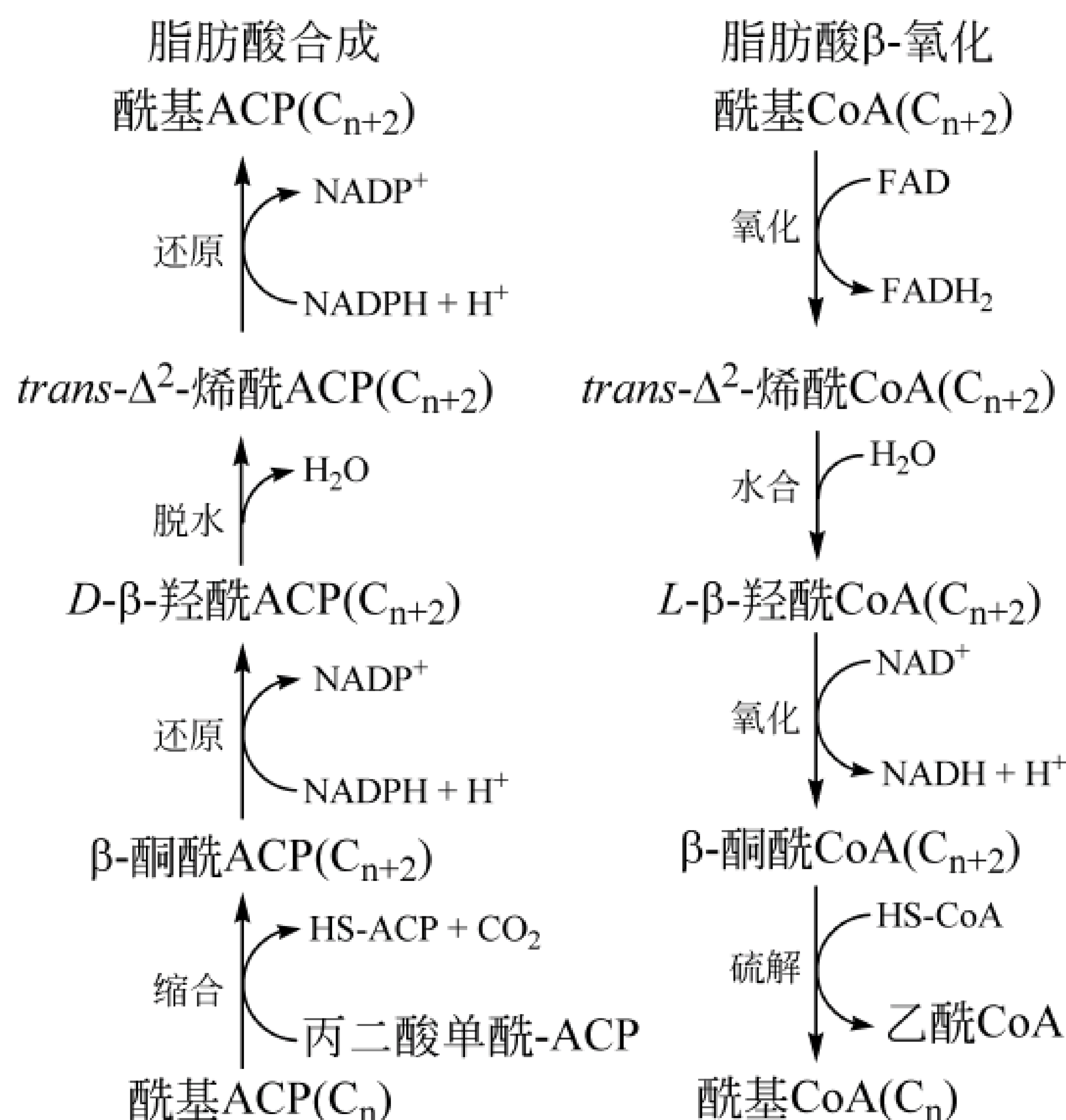


图 18.18　脂肪酸合成和脂肪酸 β-氧化

中进行的却是与合成反方向反应：氧化、水合、氧化和硫解。

在β-氧化中激活的硫酯是辅酶A(CoA)的衍生物，而在脂肪酸合成中酰基是通过硫酯键结合在酰基载体蛋白(ACP)上，但在这两种情况下酰基都是与载体中的磷酸泛酰巯基乙胺结合。合成和降解都是以二碳单位进行的，但氧化产物是乙酰CoA，而合成需要一个三碳底物丙二酸单酰ACP，它转移二碳单位到延伸的脂肪酸链上，并释放出CO_2。合成需要的还原力是NADPH，而氧化则是依赖NAD^+和FAD。此外，在脂肪酸合成中有一中间物是*D*-β-羟酰ACP，而氧化过程中生成的是*L*异构体*L*-β-羟酰CoA。

另外，脂肪酸生物合成和分解代谢途径是由完全不同的两套酶催化的。在真核细胞中脂肪酸生物合成用酶位于胞质溶胶中，而β-氧化酶限于线粒体和过氧化物酶体中。

相关话题　抑制肥胖的新靶点-乙酰CoA羧化酶

丙二酸单酰CoA除了在脂肪酸生物合成中作为脂肪酸链延长的二碳片段供体之外，还有另外一个强烈抑制肉碱酰基转移酶Ⅰ的重要调节功能。肉碱酰基转移酶Ⅰ被抑制就等于抑制了脂肪酸的氧化，显然有利于脂肪酸的合成和储存。但细胞氧化还是储存脂肪还取决于胞质溶胶里丙二酸单酰CoA的水平，水平高抑制脂肪酸氧化，水平低不仅限制了脂肪酸合成，而且也解除了对肉碱酰基转移酶Ⅰ的抑制，有利于脂肪酸氧化。如果能够将丙二酸单酰CoA的水平控制在很低的水平上，就等于促进了脂肪酸氧化，这也正是降低体内脂肪的一个理想目标。

从前面内容已了解到丙二酸单酰CoA是在乙酰CoA羧化酶(ACC)催化下由乙酰CoA羧化生成的。ACC有两个同工酶ACC1和ACC2，ACC1主要分布在肝和脂肪组织，而ACC2则存在于心脏和骨骼肌里。高浓度的葡萄糖和胰岛素会激活ACC2，而锻炼有相反的作用。在锻炼过程中，一种依赖AMP的蛋白激酶会使ACC2磷酸化，导致ACC2失活。

最近Ruderma和Abu-Elheiga等的一些研究工作从ACC2的角度探讨了体重上升和下降的本质。研究人员获得了一种缺失了编码ACC2基因的小鼠。这些小鼠吃的远比野生型的同伴多，但体内储存的脂肪却比同伴少(骨骼肌里少30%～40%，心肌里少10%)。甚至在仍然含有ACC1的脂肪组织里，三酰甘油的含量也减少了50%之多。同时这些小鼠也没有表现出其他的异样，正常地生长和繁殖，有着正常的生命周期。研究人员得出结论：ACC2的缺失导致丙二酸单酰CoA生成量减少，最终的结果就是通过解除了对肉碱酰基转移酶Ⅰ的抑制作用导致脂肪酸β氧化增加和脂肪酸合成的减少。他们预测ACC2将会成为开发抑制肥胖药物的一个新的很好的靶点。实际上现在有很多研究人员正在开发以ACC2为靶点的抑制ACC2的减肥药。

18.8　脂肪酸链的延长和去饱和

由脂肪酸合酶催化的最初产物是棕榈酸，当然细胞也容易合成短于十六个碳的短链脂肪酸。然而要合成比棕榈酸更长的脂肪酸(＞16)时，对于哺乳动物需要到线粒体和内质网

表面去完成。在线粒体中延长反应的中间代谢物是酰基 CoA，而不是酰基 ACP，使用的碳源是乙酰 CoA，不是丙二酸单酰 CoA。链的延长反应好像是脂肪酸 β-氧化的逆反应，依次经由硫解酶、羟酰-CoA 脱氢酶、羟酰 CoA 水化酶和烯酰 CoA 脱氢酶反应，但最后一步还原反应（相当于脂肪酸 β-氧化的第一步反应）中使用的辅酶是 NADPH，而不是 $FADH_2$。

内质网中的链延长反应类似于棕榈酸合成反应，丙二酸单酰 CoA 作为碳源提供二碳单位，载体为辅酶 A，NADPH 作为还原剂，棕榈酰 CoA 可延长生成硬脂酰 CoA。

脂肪酸的去饱和，即在脂肪酸中引入双键反应，细菌和真核生物都可以合成单不饱和脂肪酸，但途径完全不同。细菌的脂肪酸合酶可以在生长着的脂肪酸链（例如碳数达到 10 时）引入双键。细菌中一种特殊酶可以识别 C_{10} 中间产物，催化形成双键的反应，例如棕榈油酰的合成（图 18.19）。

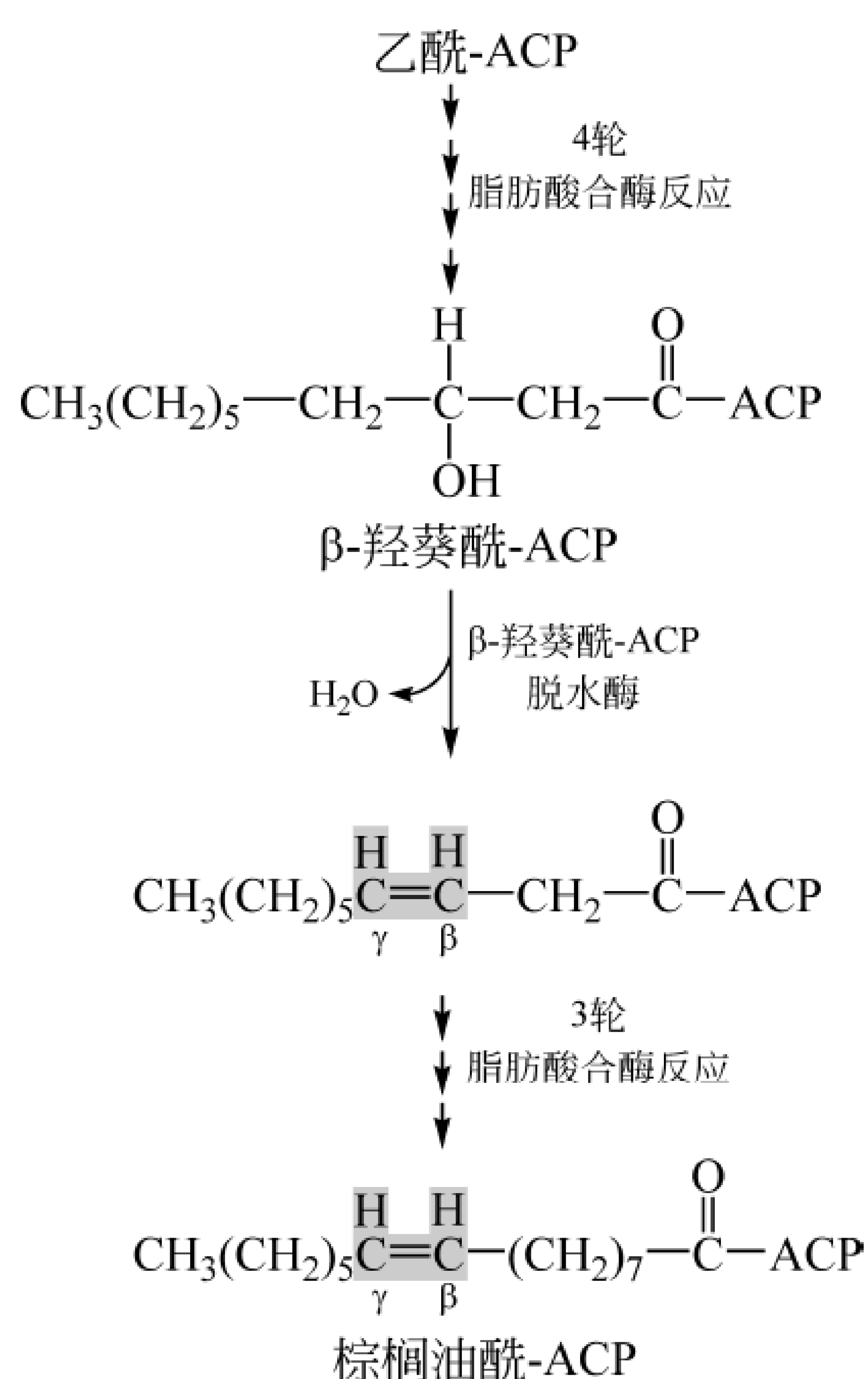


图 18.19　*E. coli* 中脂肪酸去饱和和延长反应

首先经 4 轮脂肪酸合酶反应合成棕榈酰-ACP 后，通过特殊的 β-羟葵酰-ACP 脱水酶引入双键。然后再经 3 轮脂肪酸合酶反应生成棕榈油酰-ACP

像上述 *E. coli* 那样在延长的脂肪酸链中引入双键在真核生物中却不能进行，因为真核生物没有能够识别生长着的脂肪酸中间产物，并引入双键的酶。真核生物引入双键是在内质网的一种去饱和酶催化下，由已合成的棕榈酰 CoA 和硬脂酰 CoA 去饱和形成棕榈油酸（16∶1，Δ^9）和油酸（18∶1，Δ^9）。然而像亚油酸（18∶2 $\Delta^{9,12}$）那样的多不饱和脂肪酸只有植物能够合成，但哺乳动物可以将食物中的亚油酸（被激活为亚油酰 CoA）转化为花生四烯酰 CoA（20∶4 $\Delta^{5,8,11,14}$）（图 18.20）。花生四烯酸是具有重要生理作用的前列腺素的前体。

由亚油酸转化为花生四烯酸途径中 γ-亚麻酰 CoA（18∶3）经进一步延长和去饱和可生成 C_{20} 和 C_{22} 多不饱和脂肪酸。

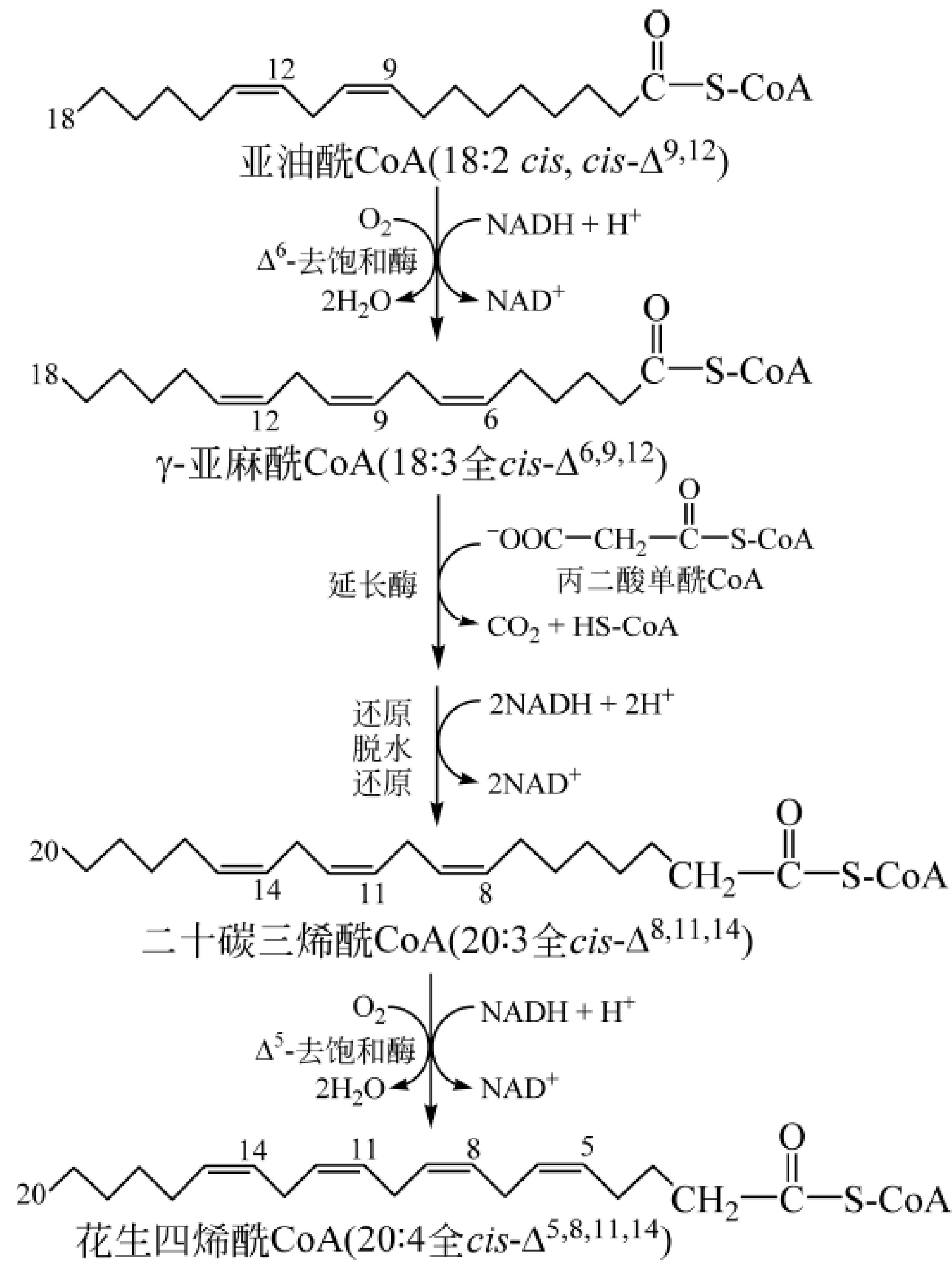


图 18.20 油酰 CoA 转化为花生四烯酰 CoA

18.9 其他脂的生物合成

细胞内以游离形式存在的脂肪酸很少,主要以酯化形式,例如三酰甘油或磷脂等形式存在。这两种类型脂的生物合成主要发生在肝细胞和脂肪细胞的内质网。

18.9.1 三酰甘油和磷脂的合成

甘油-3-磷酸在酰基转移酶(acyltransferase)催化下,依次与提供酰基的酰基 CoA 分子反应,生成在生理 pH 下带净负电荷的磷脂酸(图 18.21)。

然后磷脂酸在磷脂酸磷酸酶(phosphatidate phosphatase)催化下去磷酸,生成 1,2-二酰甘油,再经酰基转移酶催化与第 3 个酰基 CoA 反应生成三酰甘油。在磷酸胆碱转移酶催化下,1,2-二酰甘油与 CDP-胆碱生成磷脂酰胆碱;在磷酸乙醇胺转移酶催化下 1,2-二脂酰甘油与 CDP-乙醇胺反应生成磷脂酰乙醇胺(图 18.22)。

另外,磷脂酸也是酸性磷脂磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇的前体。磷脂酸首先与 CTP 反应形成 CDP-二酰甘油,释放出焦磷酸。在一些细菌中 CDP-二酰甘油的 CMP 被丝氨酸取代

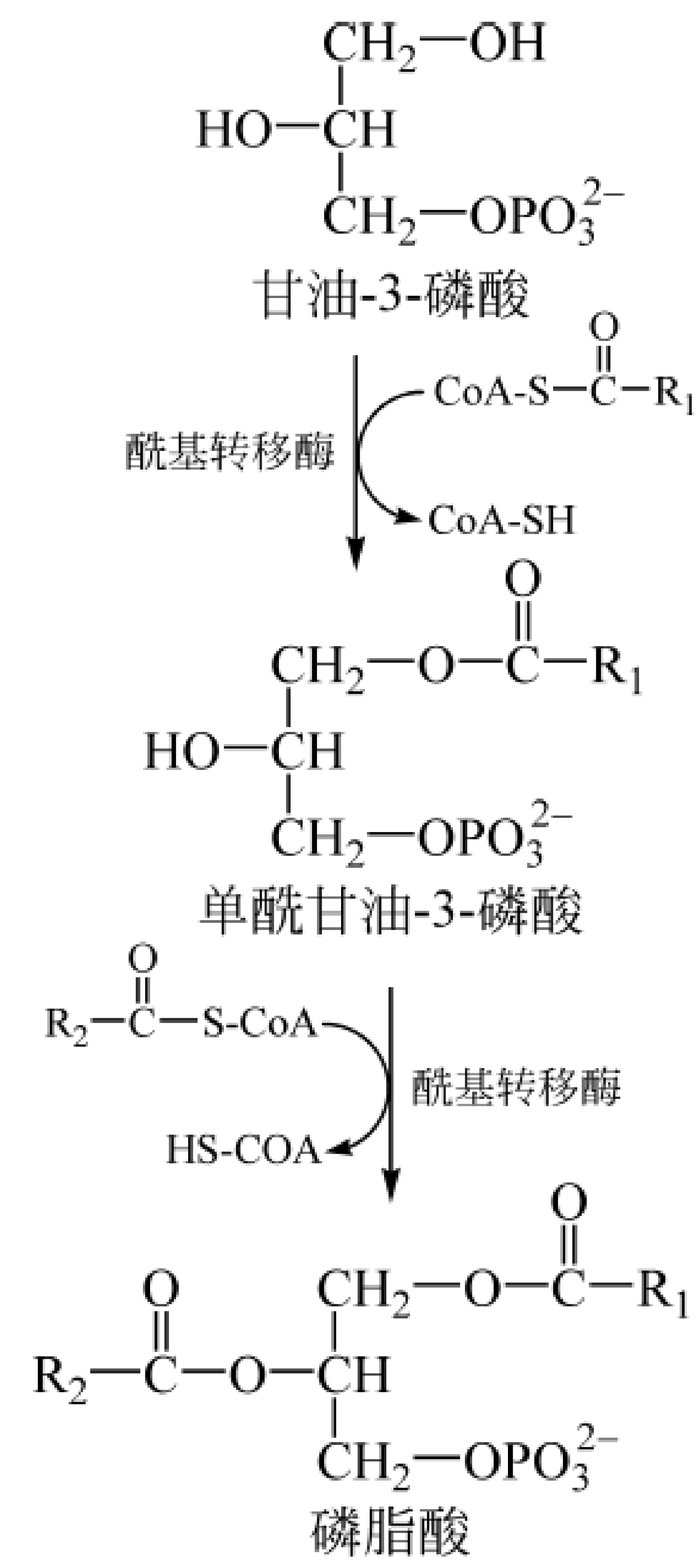


图 18.21 磷脂酸合成

生成磷脂酰丝氨酸。而在原核生物和真核生物中 CMP 都可被肌醇取代生成磷脂酰肌醇（图 18.23）。

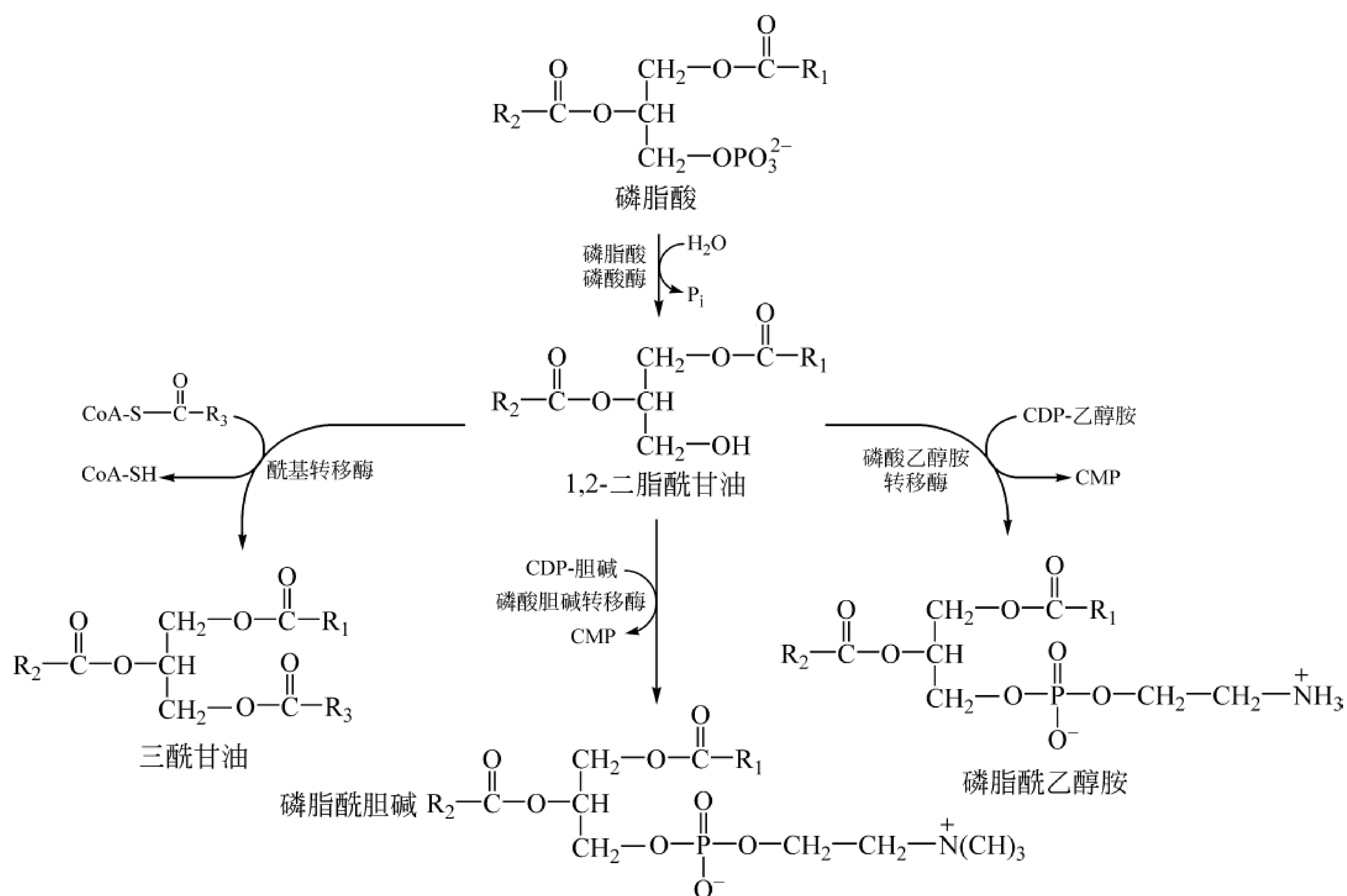


图 18.22　三酰甘油、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的合成

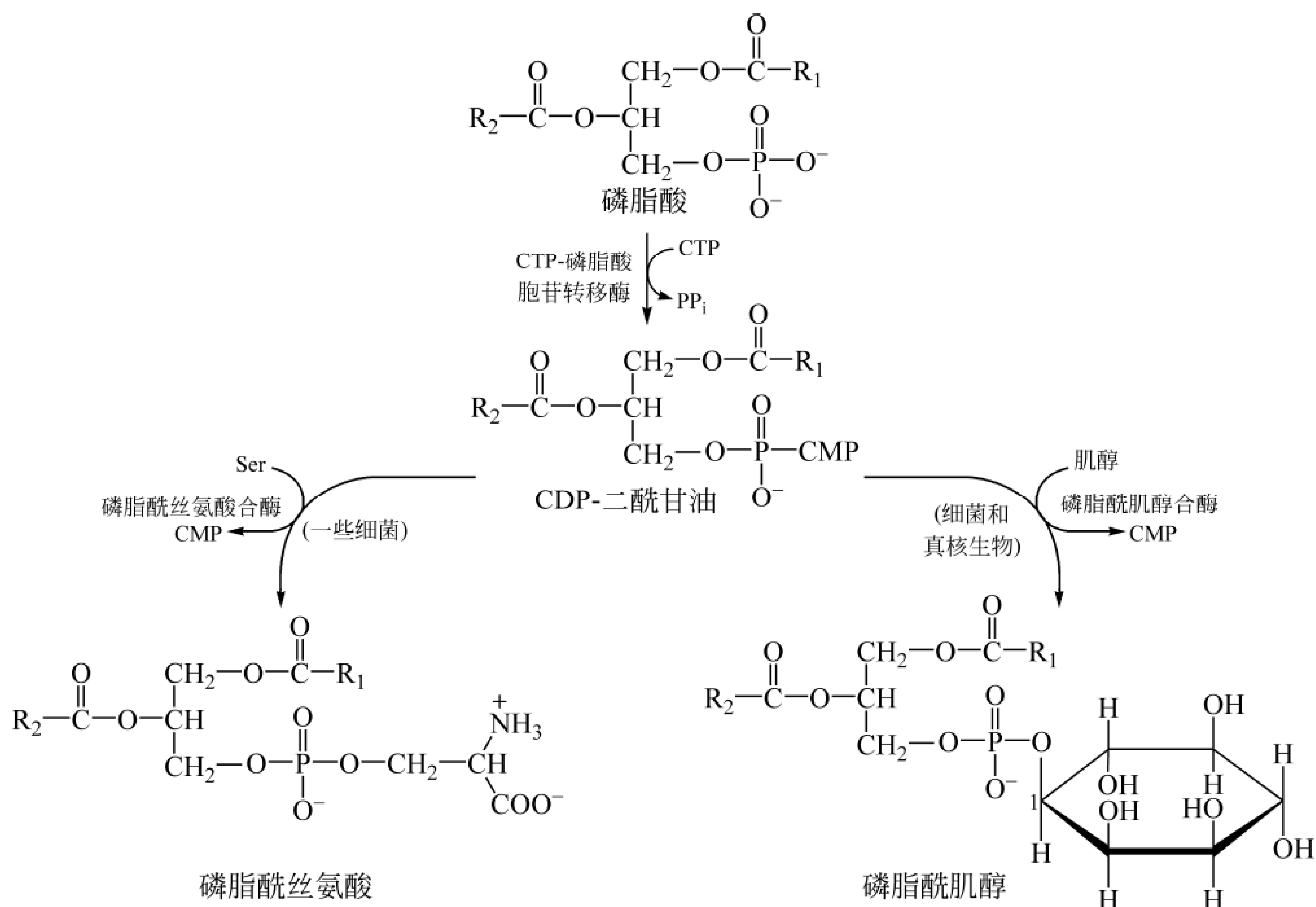


图 18.23　磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇的合成

大多数真核生物利用不同于细菌的途径合成磷脂酰丝氨酸,通过用丝氨酸取代已合成的磷脂酰乙醇胺中的乙醇胺完成磷脂酰丝氨酸的合成。

18.9.2 鞘脂的合成

鞘脂是一类以鞘氨醇为结构骨架的脂,所以要先合成鞘氨醇。首先在3-酮二氢鞘氨醇合酶催化下,棕榈酰CoA与丝氨酸缩合形成3-酮二氢鞘氨醇,然后3-酮二氢鞘氨醇被还原生成鞘氨醇。接下来在酰基转移酶催化下鞘氨醇接收酰基,再经去饱和酶催化形成神经酰胺。神经酰胺可以与磷脂酰胆碱形成鞘磷脂,也可以与UDP-半乳糖反应生成脑苷脂(半乳糖脑苷脂)(图18.24)。

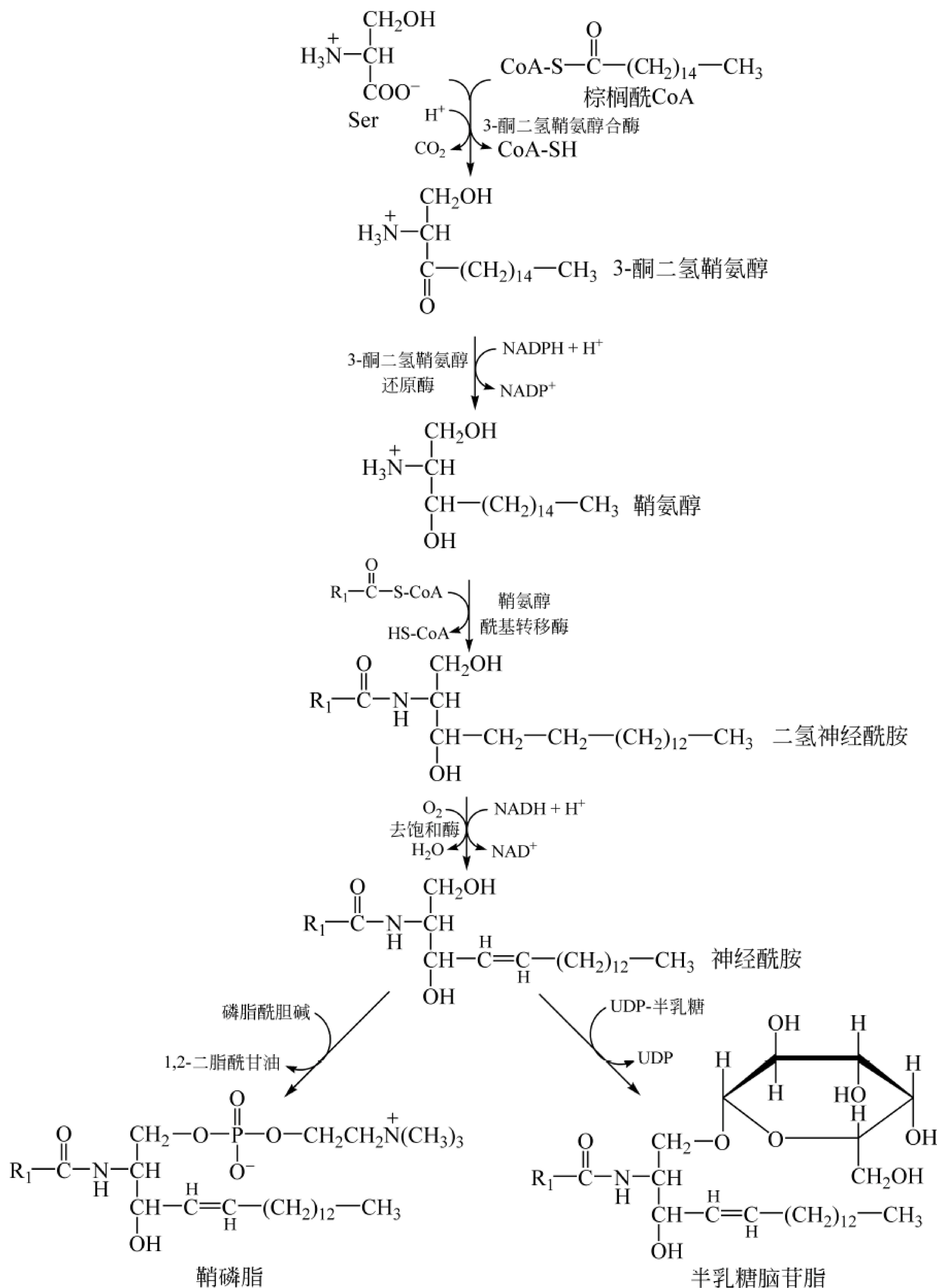


图18.24 鞘脂的合成

18.9.3 胆固醇的合成

几乎所有哺乳动物细胞都有合成胆固醇的能力，最活跃的地方是肝细胞。在肝细胞胞质溶胶中合成的和来自饮食中的胆固醇通过脂蛋白运输到身体的其他细胞。核素标记实验表明，胆固醇及由胆固醇衍生出的其他类固醇的所有碳原子都是来自乙酰 CoA 中的 2 碳单位乙酰基。3 个乙酰基缩合生成含有 6 碳的甲羟戊酸(mevalonate)。然后甲羟戊酸经三步反应生成异戊烯焦磷酸，6 分子异戊烯焦磷酸缩合生成含 30 个碳的鲨烯，最后鲨烯再转化为含 27 个碳的胆固醇(图 18.25)。

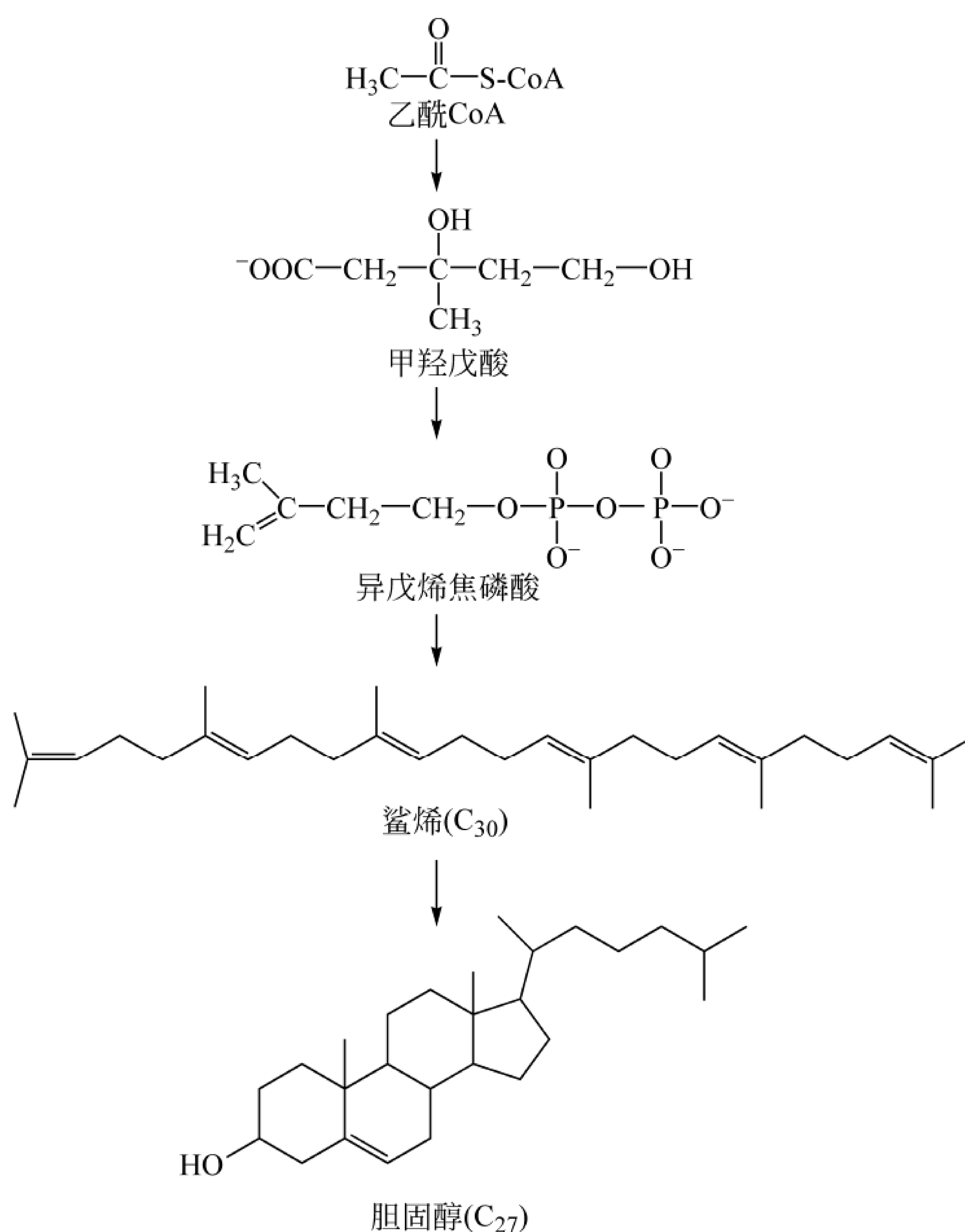


图 18.25 胆固醇生物合成

小结

1. 通过 β-氧化依次除去二碳片段，脂肪酸可降解为乙酰 CoA。脂肪酸首先通过与 CoA 的酯化作用被激活。然后酰基 CoA 依次通过重复的四步酶反应被氧化：氧化、水合、再氧化和硫解。平均每克脂肪酸氧化产生的 ATP 要比葡萄糖高。

2. 奇数碳饱和脂肪酸β-氧化生成乙酰CoA和一分子丙酰CoA。除了饱和脂肪酸氧化所需要的那些酶之外,大多数不饱和脂肪酸氧化还需要另外两个酶:异构酶和还原酶。

3. 酮体β-羟丁酸和乙酰乙酸是在肝内通过乙酰CoA缩合生成的水溶性燃料分子。

4. 脂肪酸合成途径开始于丙二酸单酰CoA的合成,反应由乙酰CoA羧化酶催化。然后丙二酸单酰CoA转换为丙二酸单酰ACP,一分子丙二酸单酰ACP与乙酰CoA(或乙酰ACP)缩合形成乙酰乙酰ACP。

5. 丙二酸单酰ACP作为二碳片段供体在脂肪酸合酶复合物催化下经重复缩合、还原、脱水和还原反应,不断地从脂肪酸的羧基端延长直至形成最终的产物十六碳棕榈酸。脂肪酸生物合成所需要的NADPH来自于乙酰CoA转运过程和戊糖磷酸途径。

6. 棕榈酸可以被延长酶和去饱和酶转化为链更长的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸,例如十八碳硬脂酸和油酸。线粒体和内质网都含有延长酶,但两者的延伸机制不同。而像亚油酸那样的多不饱和脂肪酸只有植物能够合成。

7. 三酰甘油和磷脂是磷脂酸衍生物。三酰甘油和天然磷脂经由1,2-二酰甘油中间物合成,而酸性磷脂经由CDP-二酰甘油中间物合成。

8. 鞘脂由丝氨酸和棕榈酰CoA合成。通过还原、环化和氧化作用生成神经酰胺,然后神经酰胺再通过加一个极性头部基团和糖残基进行修饰生成鞘脂。

9. 胆固醇由乙酰CoA合成,合成过程中经历甲羟戊酸和异物烯焦磷酸中间产物。胆固醇和异物烯焦磷酸两者都是其他许多化合物的前体。

习题

1. 肌肉中肉碱水平非常低的个体连适度运动都会感到肌无力,但其肌肉中三酰甘油水平却非常高。

(a) 请解释这两个现象。

(b) 这样的人能够在有氧条件下代谢肌糖原吗?

2. 除了β-氧化的酶之外,要将下列脂肪酸降解为乙酰CoA或乙酰CoA和琥珀酰CoA还需要什么样的酶?

(a) 油酸($CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COO^-$)。

(b) 全顺式花生四烯酸($CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH_2)_2COO^-$)。

(c) 顺式$CH_3(CH_2)_9CH=CH(CH_2)_4COO^-$。

3. 奥利司他(Orlistat)为胰脂酶的抑制剂,是一种治疗肥胖的药。请给出它用于治疗肥胖的机制?

4. 为什么酗酒者可能患有“脂肪肝”?

5. 出于好奇,如果将鲸鱼和其他鱼的脂肪作为你惟一的食物,

(a) 缺少糖对你利用脂肪会有什么样的影响?

(b) 你估计你的呼吸中会出现什么气味?

(c) 如果在上述脂肪中加入奇数碳脂肪酸,结果又会怎样呢?

6. 如果缺乏维生素B_{12},对于脂肪酸氧化将产生什么后果?

7. 婴儿断奶前血液中酮体含量很高,且其组织中(除肝外)β-酮酰CoA转移酶(琥珀酰

CoA 转移酶)含量丰富。这对婴儿营养有什么益处?

8．当肝脏的 β-氧化作用超过柠檬酸循环的容量时,过量生成的乙酰 CoA 会形成酮体,即乙酰乙酸、β-羟丁酸和丙酮。这种情况会出现在严重的糖尿病患者身上,因为这些患者的组织不能利用葡萄糖,只好以氧化大量的脂肪酸来代替。尽管乙酰 CoA 没有毒性,但线粒体也必须将它转化成酮体,如果不能转换将出现什么问题? 这种转换带来什么好处?

9．当把下列物质加入到肝脏匀浆液中进行棕榈酸合成时,标记的碳原子出现在棕榈酸分子的什么位置?

(a) $H^{14}CO_3^-$　(b) $H_3^{14}CCOS$-CoA

10．有人提出丙二酸单酰 CoA 可能是一种发送到脑降低食欲响应的信号。当给小鼠服用一种名为 C75 的浅蓝菌素的衍生物(一种真菌的环氧化物),它们的食欲被抑制,并且体重快速减少。表明浅蓝菌素和它的衍生物是脂肪酸合酶的有效的抑制剂。为什么 C75 可以作为一种有效的减肥药? 给出你的解释。

19 氨基酸代谢

氨基酸的主要用途是作为构件分子用于蛋白质的合成，另外，作为氮源还可用于其他含氮化合物，例如核苷酸碱基等化合物的合成。与脂肪酸和葡萄糖不同，超过合成所需的氨基酸，即过量的游离氨基酸不能储存，也不能直接排泄，但可作为燃料通过降解提供能量，或合成脂肪。

人和动物一方面从食物中摄取蛋白质，在消化道内被多种蛋白酶水解成氨基酸，经小肠吸收，进入血液；另一方面，体内的蛋白质也不断地降解为氨基酸，这些分布于血液和各个组织内的全部游离氨基酸称为氨基酸代谢库。

体内蛋白质不断在进行着转换，实际上就是氨基酸的降解和生物合成。本章先从蛋白质的降解讲起，然后描述氨基酸的分解代谢和生物合成。

19.1 蛋白质的降解

在几乎所有的细胞内，蛋白质都在不断地进行合成和降解，这一过程称为蛋白质转换(protein turnover)。每一种蛋白质都在以不同的速率进行转换。他们的半衰期(half-lives)差异很大，有的数十秒，有的数天，也有的长达数周，甚至更长的时间。生物体之所以采取各种不同的转换速率为的是确保某些调节蛋白质快速转换来适应随时变化的环境。此外，蛋白质降解可随时清除错误折叠和去折叠的蛋白质以及防止不需要的蛋白质的积累。

在真核细胞中一些蛋白质通过溶酶体内的蛋白酶降解。包裹了需要降解的蛋白质的液泡与溶酶体融合，然后被溶酶体中的各种蛋白酶水解。通常情况下，溶酶体中的酶都能将捕获的蛋白质降解掉，也可以说底物是非选择性的。

有些蛋白质是通过泛素(ubiquitin)介导的蛋白酶体途径降解的，这一途径是蛋白质有选择的降解途径。待降解的蛋白质(靶蛋白)首先要"贴上"泛素标记，这一过程称为蛋白质泛素化(作用)(protein ubiquitination)。泛素化靶蛋白随后在蛋白酶体(proteasome)内被降解成肽段(图 19.1)。泛素遍布于真核生物界，是一个由 76 个氨基酸残基构成的高度保

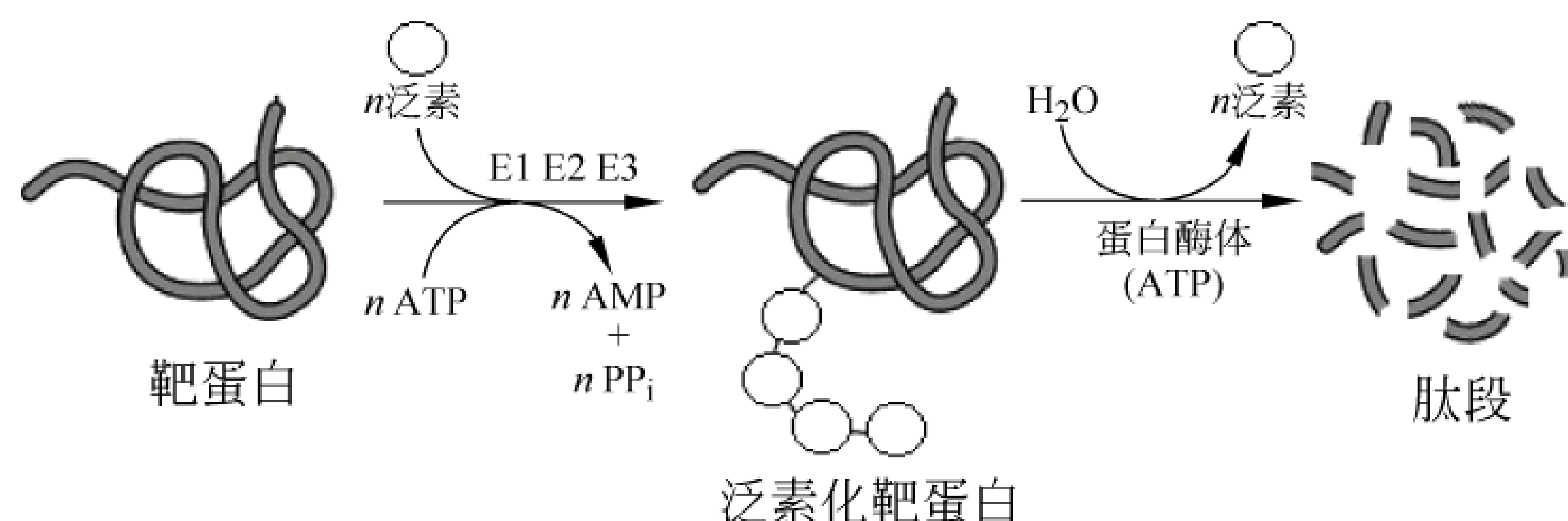


图 19.1 靶蛋白泛素化和水解

守的单体蛋白质，例如酵母、人、果蝇等不同生物中的泛素都相同。

从图 19.1 看泛素介导的蛋白质降解似乎是个比较简单的过程，而实际上蛋白质泛素化和水解是个比较复杂的过程。涉及 3 个酶催化的反应：首先在泛素活化酶（ubiqutin-activating enzyme，E1）催化下，伴随着 ATP 水解泛素的羧基端以硫酯键与 E1 相连；然后泛素由 E1 转移到泛素缀合酶（ubiqutin-conjugating enzyme，E2）上；泛素-蛋白质连接酶（ubiqutin-protein ligase enzyme，E3）识别和选定待降解蛋白质（靶蛋白），并催化泛素由 E2 转移到靶蛋白中 Lys 残基的 ε 氨基上。重复上述反应，可生成一个附着一条多聚泛素链的靶蛋白。泛素化的靶蛋白最终在蛋白酶体中被降解成许多肽段，肽进一步被水解为氨基酸。

Aaron Ciechanover，Avram Hershko 和 irwin Rose 因发现了泛素介导的蛋白质降解途径而共同获得了 2004 年 Nobel 化学奖。

19.2 氨基酸的分解代谢

氨基酸的分解代谢开始于脱氨，脱去的氨进入氨基代谢途径，而脱氨剩下的碳骨架（α-酮酸）用于其他化合物的合成或被彻底降解为二氧化碳（图 19.2）。

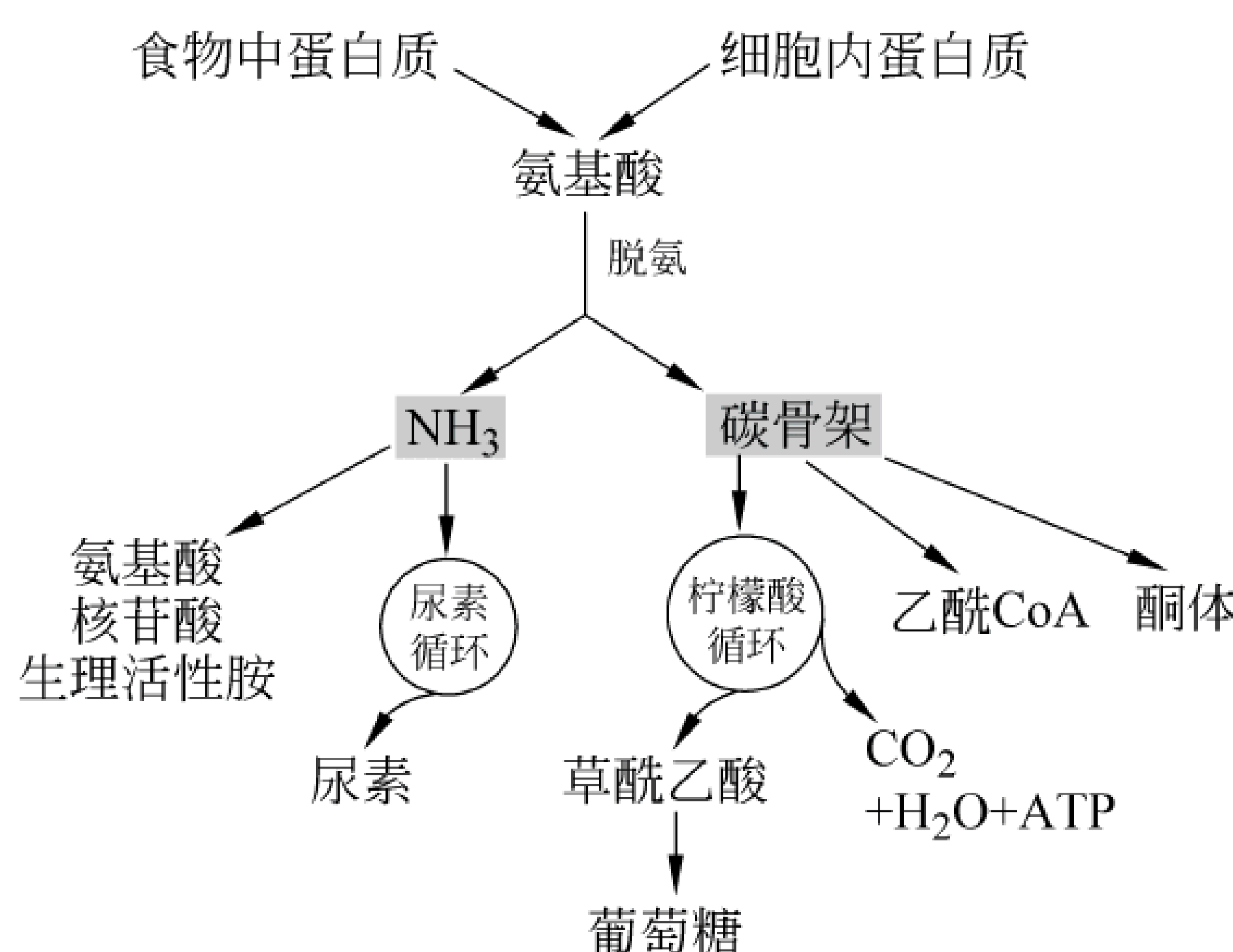


图 19.2 氨基酸的分解代谢途径

19.2.1 氧化脱氨

大多数氨基酸通过氧化脱氨方式脱氨（图 19.3）。首先在转氨酶催化下氨基酸的氨基转给 α-酮戊二酸，生成谷氨酸和相应的酮酸。然后谷氨酸在谷氨酸脱氢酶（glutamate dehydrogenase）催化下脱去氨。氧化脱氨发生在肝线粒体内，谷氨酸脱氢酶辅酶为 NAD^+，也可以是 $NADP^+$。

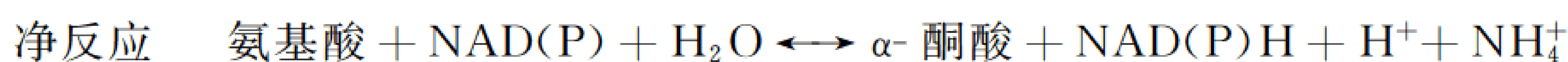
综合图 19.3 中转氨和氧化脱氨两个反应（有的教科书中将两个反应综合起来称为联合脱氨作用），净反应结果就是氨基酸的氨基以氨形式释放，同时生成 α-酮戊二酸和 NAD(P)H。



氨基酸 + α- 酮戊二酸 ⟷ α- 酮酸 + 谷氨酸



谷氨酸 + NAD(P) + H_2O ⟷ α- 酮戊二酸 + NAD(P)H + H^+ + NH_4^+



净反应　氨基酸 + NAD(P) + H_2O ⟷ α- 酮酸 + NAD(P)H + H^+ + NH_4^+

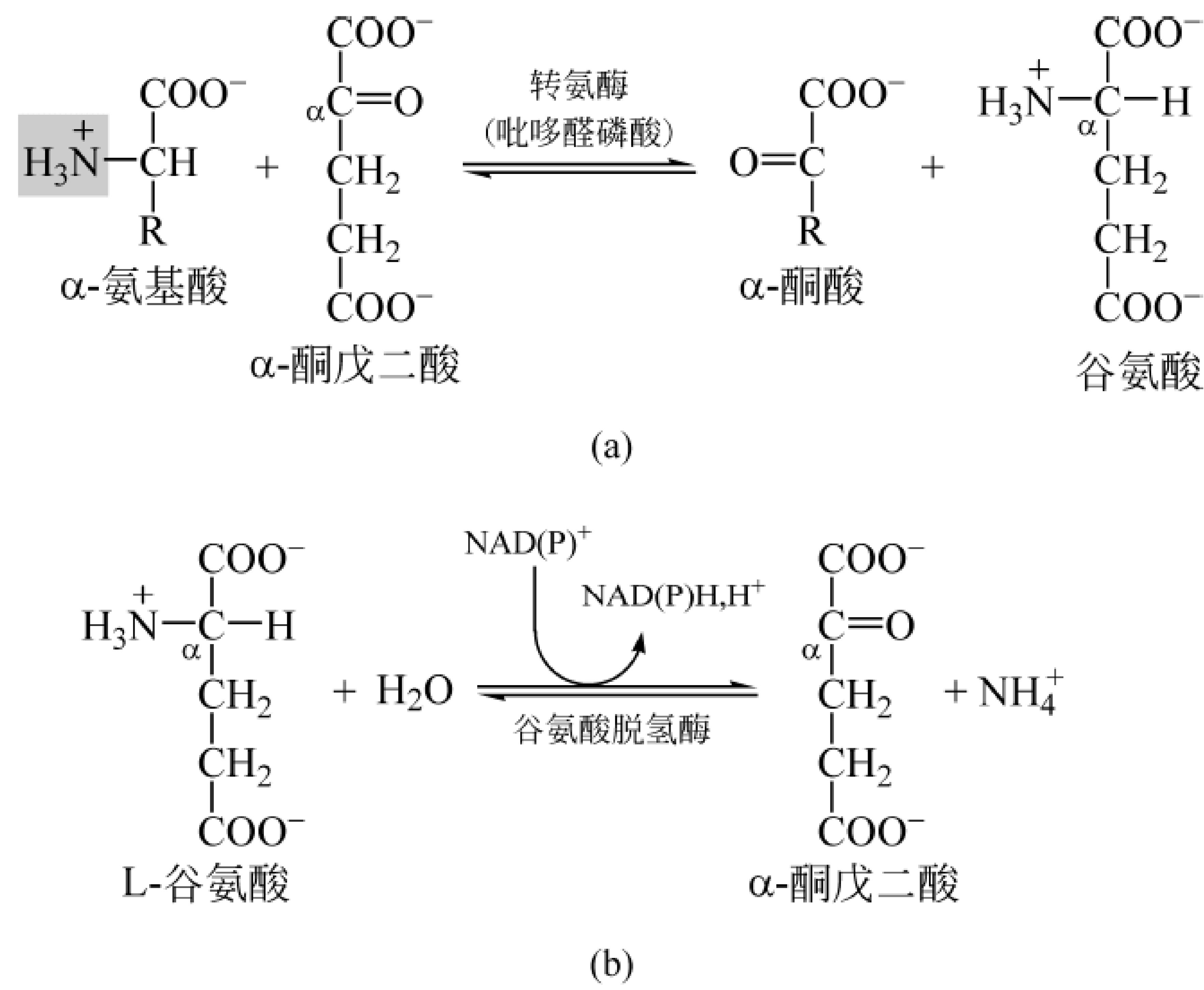


图 19.3 氧化脱氨

(a) 氨基酸经转氨作用生成谷氨酸;(b) 氧化脱氨,谷氨酸脱氨生成 α-酮戊二酸和游离的氨

谷氨酰胺和天冬酰胺的酰胺基可以分别经特殊的谷氨酰胺酶和天冬酰胺酶催化生成氨和相应的谷氨酸和天冬氨酸。

19.2.2 氨的转运

由于氧化脱氨发生在肝内,所以其他组织要降解的氨基酸就必须要转运到肝(图 19.4)。

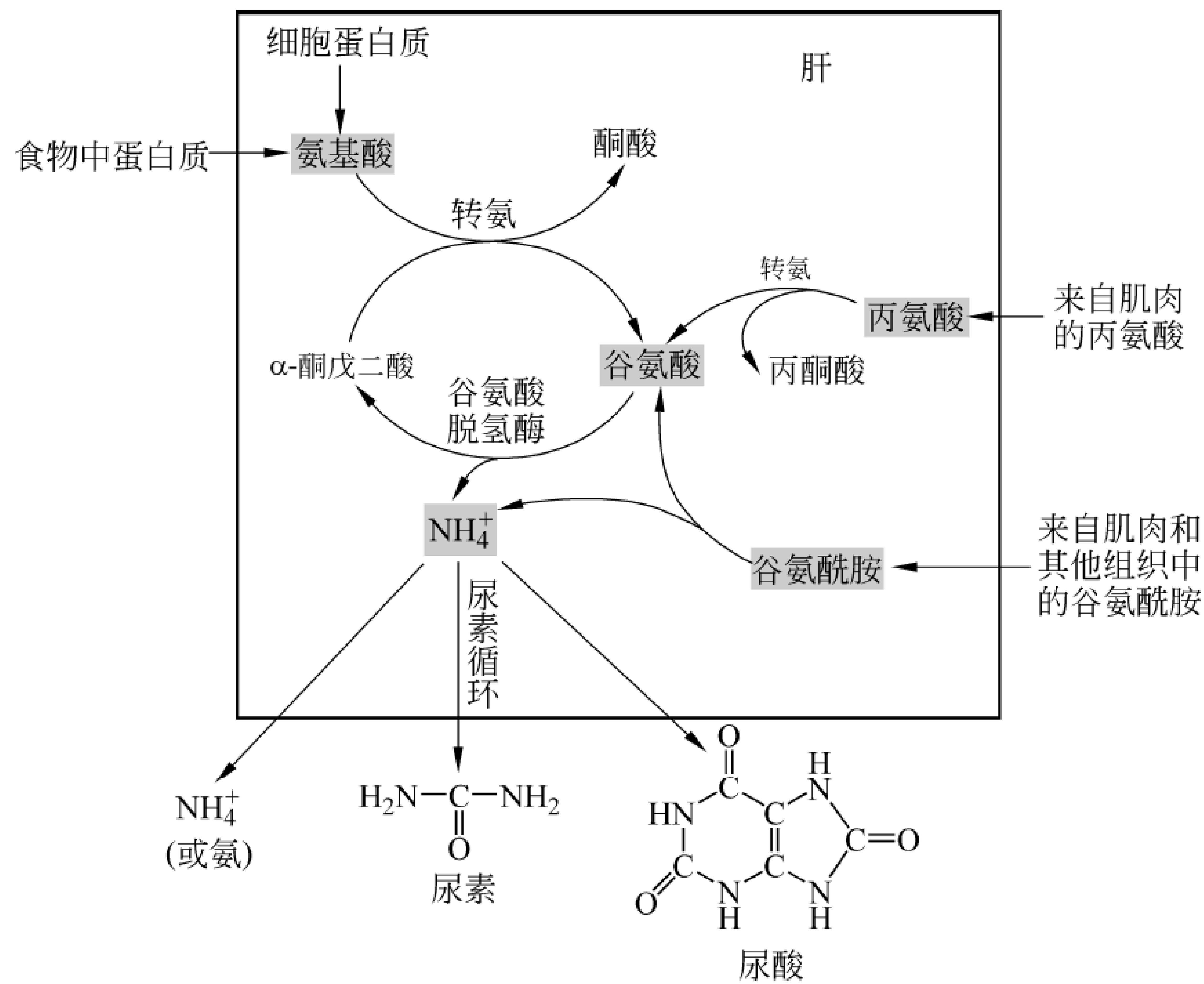


图 19.4 氨转运和分解代谢

肌肉和大多数组织利用谷氨酰胺合成酶将氨整合到谷氨酸中，转换为无毒的谷氨酰胺，然后谷氨酰胺通过血液转运到肝，再经谷氨酰胺酶水解生成谷氨酸和氨(图 19.5)。

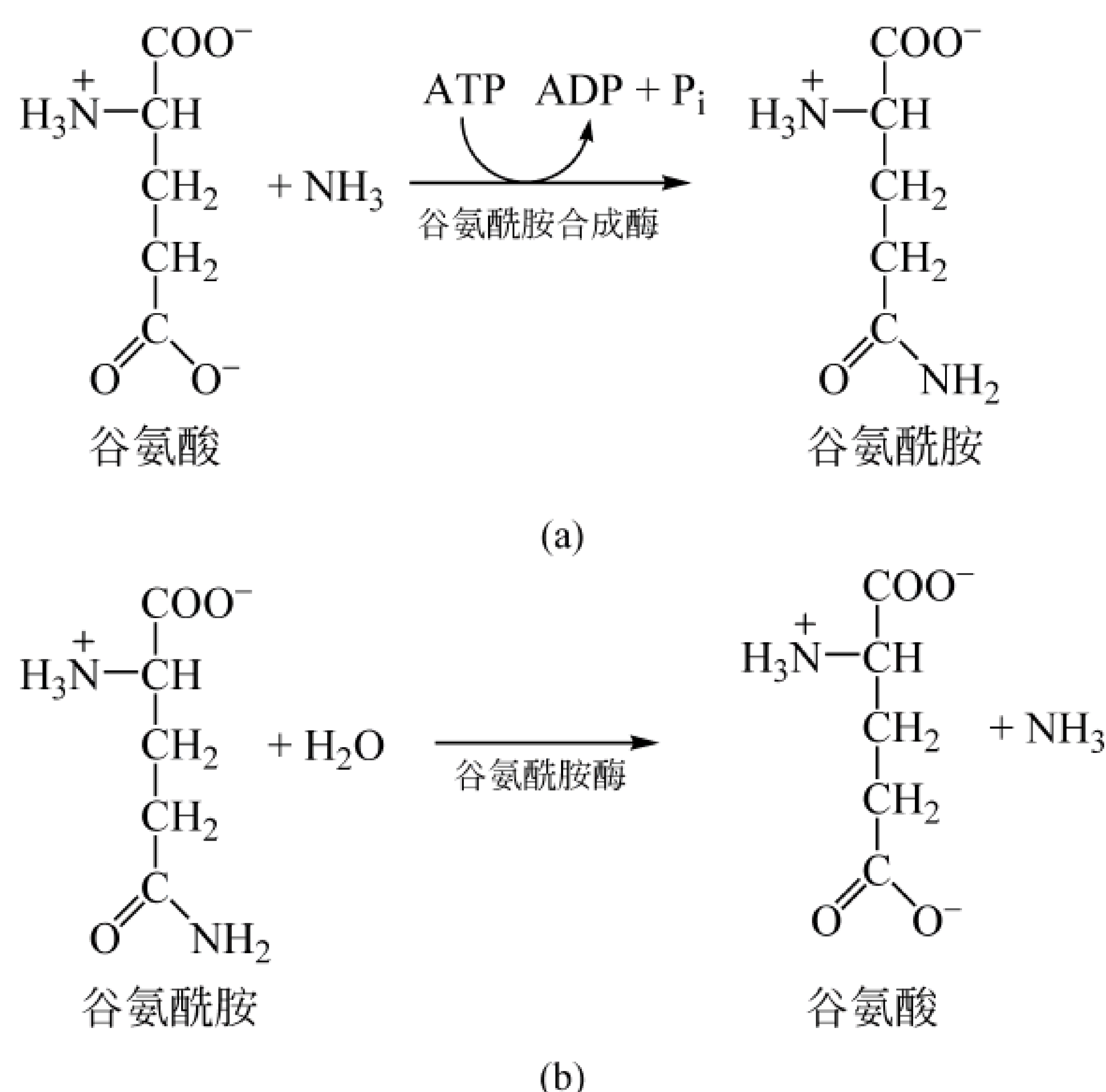


图 19.5 谷氨酰胺合成和水解反应

(a) 谷氨酸与氨合成谷氨酰胺；(b) 谷氨酰胺水解生成谷氨酸和氨

肌肉组织还利用糖异生一节中提到的葡糖-丙氨酸循环途径将氨转运到肝。在肌肉组织中经转氨反应将谷氨酸氨基转移给丙酮酸，生成的丙氨酸经血液转运到肝，再经上述转氨的逆反应重新生成谷氨酸，经谷氨酸脱氢酶催化生成 NH_3。所以肌肉组织通过葡糖-丙氨酸循环既排除了有毒的氨，又能将丙酮酸转运到肝用于糖异生。

另外，食物中蛋白质和细胞内蛋白质降解生成的氨基酸，经转氨反应都可生成谷氨酸，再经谷氨酸脱氢酶催化生成 NH_3。

在生理条件下，代谢中生成的大多数氨是以质子化形式 NH_4^+ 存在的。也有少数反应生成的氨是非质子化形式 NH_3。由于氨能渗透许多生物膜，对细胞来说氨是毒性很强的物质，所以，通常细胞内氨的浓度都维持在很低的水平。过量的 NH_4^+ 因生物种类不同而以不同代谢产物排泄。

许多水生动物，例如鱼可以通过鳃组织的细胞膜直接排氨。生活在陆地上的大多数脊椎动物可以将氨转化为毒性很小的不带电荷的、水溶性的化合物尿素，通过血液转运到肾，作为尿的主要成分被排泄掉。鸟和许多爬行动物可以将过量的氨转化为尿酸排泄掉，尿酸也是鸟、爬行动物和灵长类动物嘌呤核苷酸降解的产物。

19.2.3 尿素循环

对于哺乳动物，转运到肝的氨，以尿素形式排出体外。尿素合成发生在肝中的尿素循环(urea cycle)，也称为鸟氨酸循环(Orinithine cycle)。尿素循环是 Hans Krebs 和 Kurt Henseleit 于 1932 年阐明的。

Krebs 等提出尿素循环是依据以下一些实验现象：在所有可合成尿素的动物肝中存在

着高水平的精氨酸酶；大鼠肝切片可以使氨转化为尿素；加入鸟氨酸可促进尿素的合成，而且合成的尿素的量大大地超过所加鸟氨酸的量，表明鸟氨酸起着催化剂的作用。

图19.6给出了生成尿素的5步反应，其中2步反应发生在线粒体内，其余3步反应发生在胞质溶胶中。

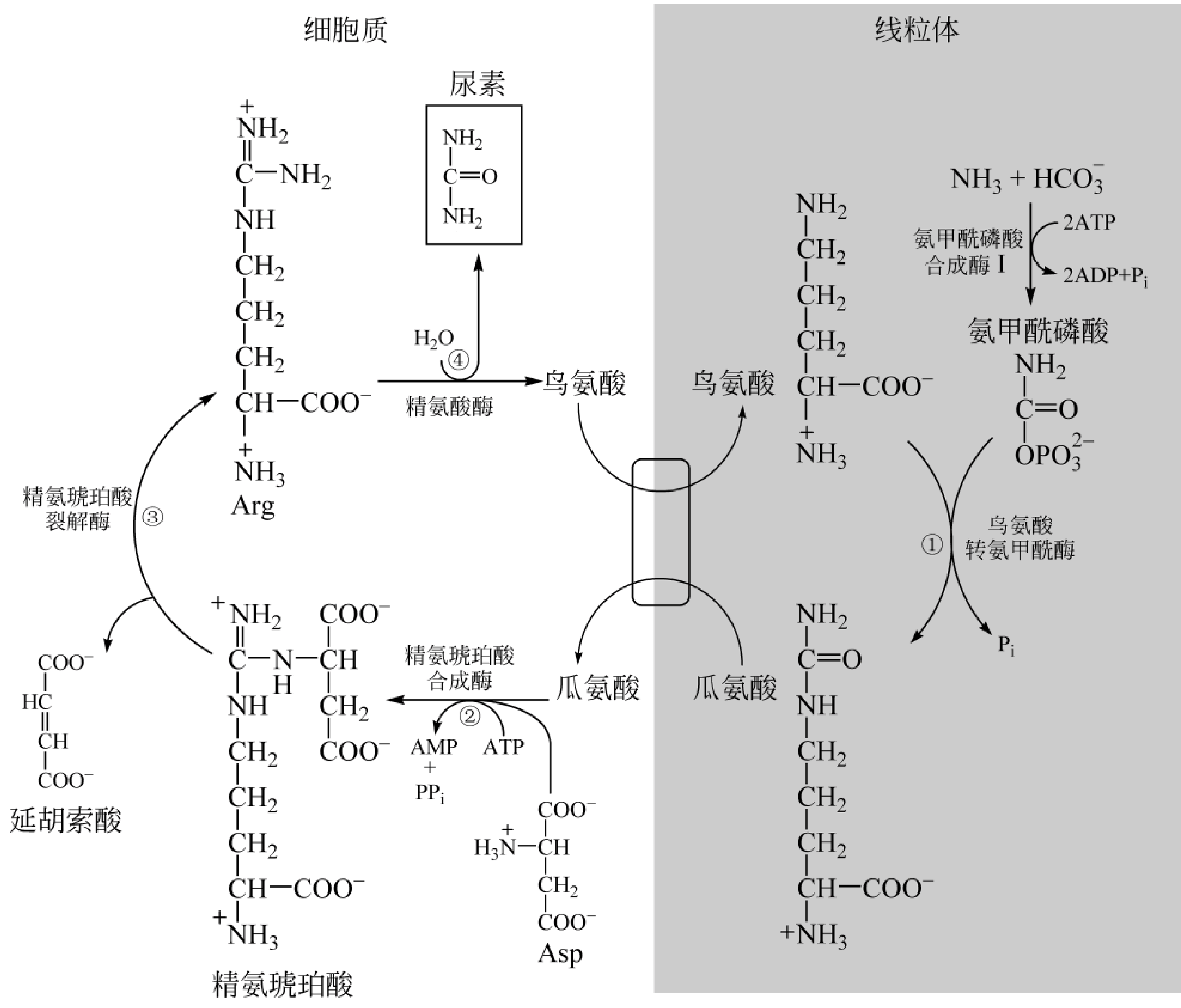
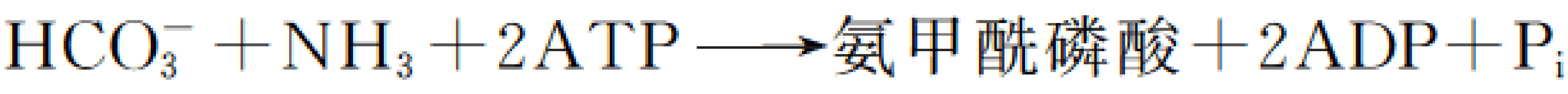


图19.6　尿素循环

1. 氨甲酰磷酸的合成

在肝细胞线粒体内氨甲酰磷酸合成酶Ⅰ(carbamyl phosphate synthetase Ⅰ,CPSⅠ)催化下，氨、碳酸氢盐和ATP合成氨甲酰磷酸。CPSⅠ是肝细胞线粒体中最丰富的酶之一，占线粒体基质内总蛋白质的20%以上。



$$HCO_3^- + NH_3 + 2ATP \longrightarrow \text{氨甲酰磷酸} + 2ADP + P_i$$

真核生物中存在两种氨甲酰磷酸合成酶，上述CPSⅠ分布于线粒体，以氨作为氮供体，参与尿素合成。另一种CPSⅡ分布于胞质溶胶，以谷氨酰胺作为氮供体，也是催化氨甲酰磷酸的合成，但参与的是嘧啶核苷酸合成。

2. 尿素循环

就像图19.6表示的那样，真正尿素循环所涉及的反应是由4步酶促反应组成的，第1步反应发生在线粒体内，其余3步反应发生在胞液中。

(1) 尿素循环的第1个反应发生在线粒体内，在鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transcarbamylase)催化下，氨甲酰磷酸的氨甲酰基被转移到尿素循环的中间代谢物鸟氨酸(ornithine)

分子上，形成瓜氨酸(citrulline)。然后，瓜氨酸通过特定的转运体被转运出线粒体，同时鸟氨酸被转运到线粒体内。



$$\text{氨甲酰磷酸}+\text{鸟氨酸}\longrightarrow\text{瓜氨酸}+P_i$$

(2) 进入胞质溶胶的瓜氨酸与天冬氨酸缩合形成精氨琥珀酸(argininosuccinate)，这个需要 ATP 的反应由精氨琥珀酸合成酶(argininosuccinate synthetase)催化。通过这步反应，将用于尿素合成的第二个氮原子整合到了尿素的前体分子中。



$$\text{瓜氨酸}+\text{天冬氨酸}+ATP\longrightarrow\text{精氨琥珀酸}+AMP+PP_i$$

(3) 在精氨琥珀酸裂解酶(argininosuccinate lyase)催化下精氨琥珀酸裂解为精氨酸和延胡索酸。



$$\text{精氨琥珀酸}\longrightarrow\text{精氨酸}+\text{延胡索酸}$$

(4) 尿素循环最后一步反应，精氨酸酶(arginase)催化精氨酸水解生成鸟氨酸和尿素。生成的鸟氨酸又被转运到线粒体内，与氨甲酰磷酸缩合，开始另一轮尿素循环。



$$\text{精氨酸}+H_2O\longrightarrow\text{鸟氨酸}+\text{尿素}$$

尿素中 2 个氮原子前体是氨和天冬氨酸，而尿素中的碳原子来自于碳酸氢盐。经 5 步反应后，尿素合成的总反应可表示如下：





$$NH_3+HCO_3^-+\text{天冬氨酸}+3ATP\longrightarrow$$
$$\text{尿素}+\text{延胡索酸}+2ADP+2P_i+AMP+PP_i$$

焦磷酸快速水解，因此合成 1 分子尿素共消耗了 4 个等价的 ATP，即在生成氨甲酰磷酸时消耗了 2 个 ATP，在合成精氨琥珀酸时消耗了 2 个等价 ATP。来自肝的尿素通过血液输送到肾，然后在肾以尿的成分排出。形成 1 分子尿素可清除 2 分子氨和 1 分子 CO_2。尿素是中性无毒物质，所以它不仅可消除氨的毒性，还可减少 CO_2 溶于血液所产生的酸性。

在尿素循环中生成的延胡索酸很重要，通过延胡索酸可以将尿素循环与柠檬酸循环连接起来。研究发现胞质溶胶中含有延胡索酸酶和苹果酸脱氢酶的同工酶，所以延胡索酸可以转化为苹果酸，然后再转化为草酰乙酸。草酰乙酸可进一步代谢，如经转氨生成天冬氨酸；经糖异生途径合成葡萄糖，或转运到线粒体内参与柠檬酸循环等反应。

相关话题　肝昏迷(氨中毒)

据 1988 年《新观察》第十六期的一段报道：1945 年 6 月，法西斯德国宣布无条件投降后，被关押在一个集中营里的 230 多名盟军官兵获救了，新建立的地方政权用丰盛酒席庆祝反法西斯战士重获自由。然而酒席过后，这些官兵们接二连三地死去，但陪同进餐的人却安然无恙。

什么原因造成官兵死亡？是法西斯残余分子在食物中投毒，还是其他原因致死。由侦探和专门医生组成的专案组立刻展开调查。专案组的调查很快有了结果，这些官兵是氨中毒而死，而非他杀。因为长期饥肠辘辘的人暴饮暴食高蛋白食物后，血液中氨剧增，产生中毒现象：视力模糊、语言紊乱、机体震颤、昏迷甚至死亡。

虽然氨中毒的机制现在还没有完全研究清楚，但普遍的解释是肝排氨是保持体内处于低氨水平的关键，当肝受到严重损伤后，不能合成尿素，血氨浓度急剧增高。高浓度氨进入

脑内,与α-酮戊二酸结合,导致柠檬酸循环中的“催化剂”α-酮戊二酸减少,削弱了柠檬酸循环,使ATP量减少,引起大脑功能障碍,发生昏迷,这就是常说的“肝昏迷”。

19.2.4 氨基酸碳骨架的降解

图19.7给出了氨基酸碳骨架降解的命运。20种氨基酸被降解为丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酰CoA、延胡索酸、草酰乙酸、乙酰CoA和乙酰乙酰CoA 7种代谢物中的一种。

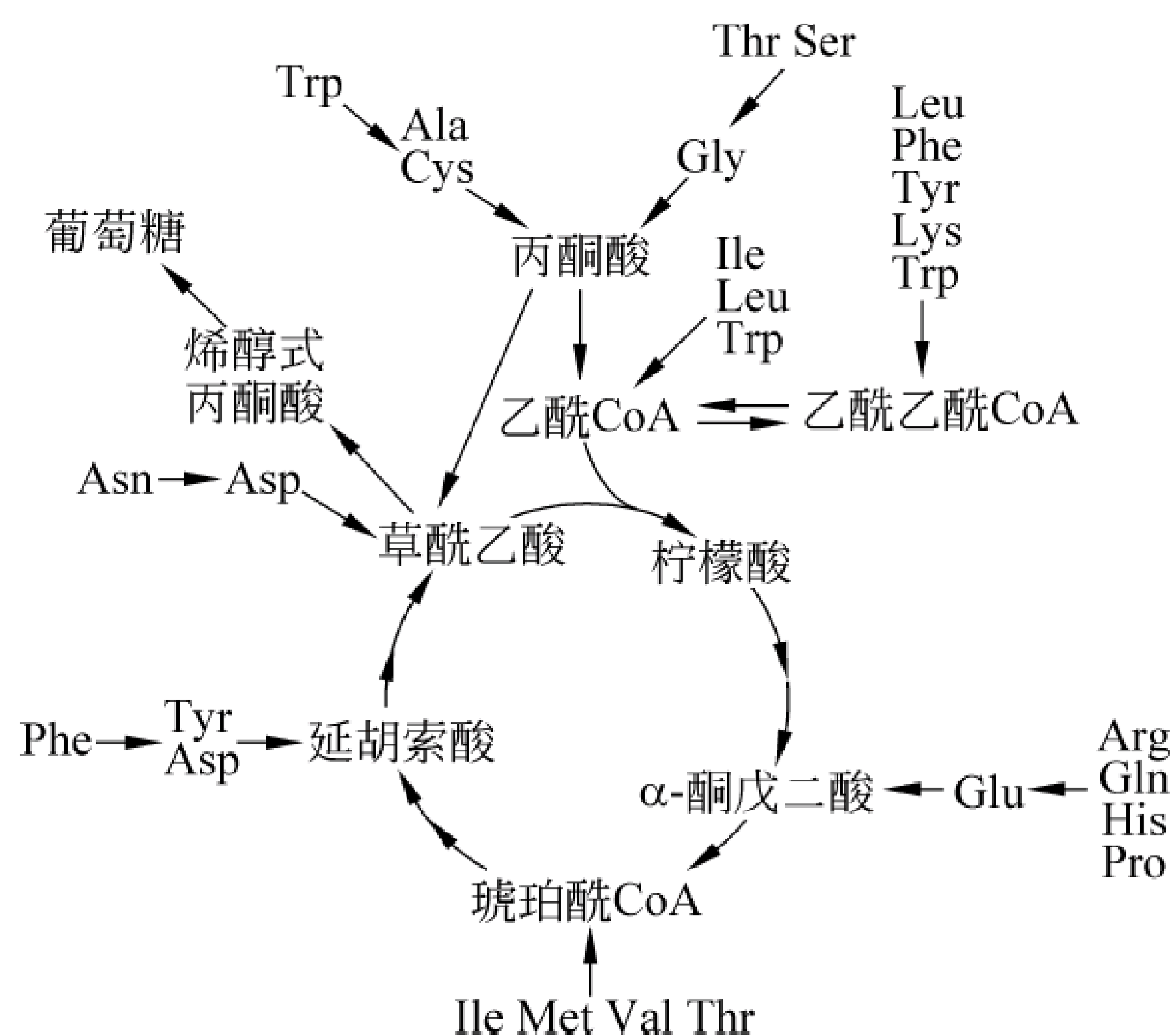


图19.7 20种氨基酸碳骨架降解途径

其中可降解为丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酰CoA、延胡索酸或草酰乙酸的氨基酸,例如谷氨酸等称为生糖氨基酸(glucogenic amino acid),因为这些代谢物可作为前体合成葡萄糖。而降解为乙酰CoA或乙酰乙酰CoA的氨基酸,例如赖氨酸和亮氨酸等称为生酮氨基酸(ketogenic amino acid),因为乙酰CoA或乙酰乙酰CoA可成为脂肪酸或酮体合成的前体。其中有些氨基酸既是生糖氨基酸,又是生酮氨基酸,例如苯丙氨酸和色氨酸等。

由于20种氨基酸的碳骨架降解途径都不一样,过程也比较复杂,就不一一进行描述了。下面举一个典型氨基酸-苯丙氨酸的降解途径(图19.8)。

在苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase)催化下苯丙氨酸首先转化为酪氨酸。酪氨酸经转氨脱氨、氧化、开环和水解等过程生成乙酰乙酸和延胡索酸。延胡索酸可以经糖异生生成葡萄糖,而乙酰乙酸是个酮体,所以酪氨酸和苯丙氨酸都是既生糖又生酮氨基酸。

在苯丙氨酸代谢过程中,由于遗传缺陷会产生代谢疾病。例如苯酮尿症就是由于缺少苯丙氨酸羟化酶造成的,由于缺少这个羟化酶造成苯丙氨酸堆积,导致血液中苯丙氨酸浓度升高(高苯丙氨酸血症)。过量的苯丙氨酸会经转氨酶催化生成苯丙酮酸,然而苯丙酮酸也不能在体内进一步代谢,造成苯丙酮酸堆积。此时病人尿中排出大量的苯丙酮酸,称为苯酮尿症(phenyl ketonuria)。苯丙酮酸堆积对神经有毒害作用,智力发育将出现障碍。确诊患有苯酮尿症的病人(大都为儿童)通常都不到10岁,给他们提供低苯丙氨酸食物(如无苯丙氨酸奶粉等),10岁之后,高苯丙氨酸血症的有害性就没有那样严重了。

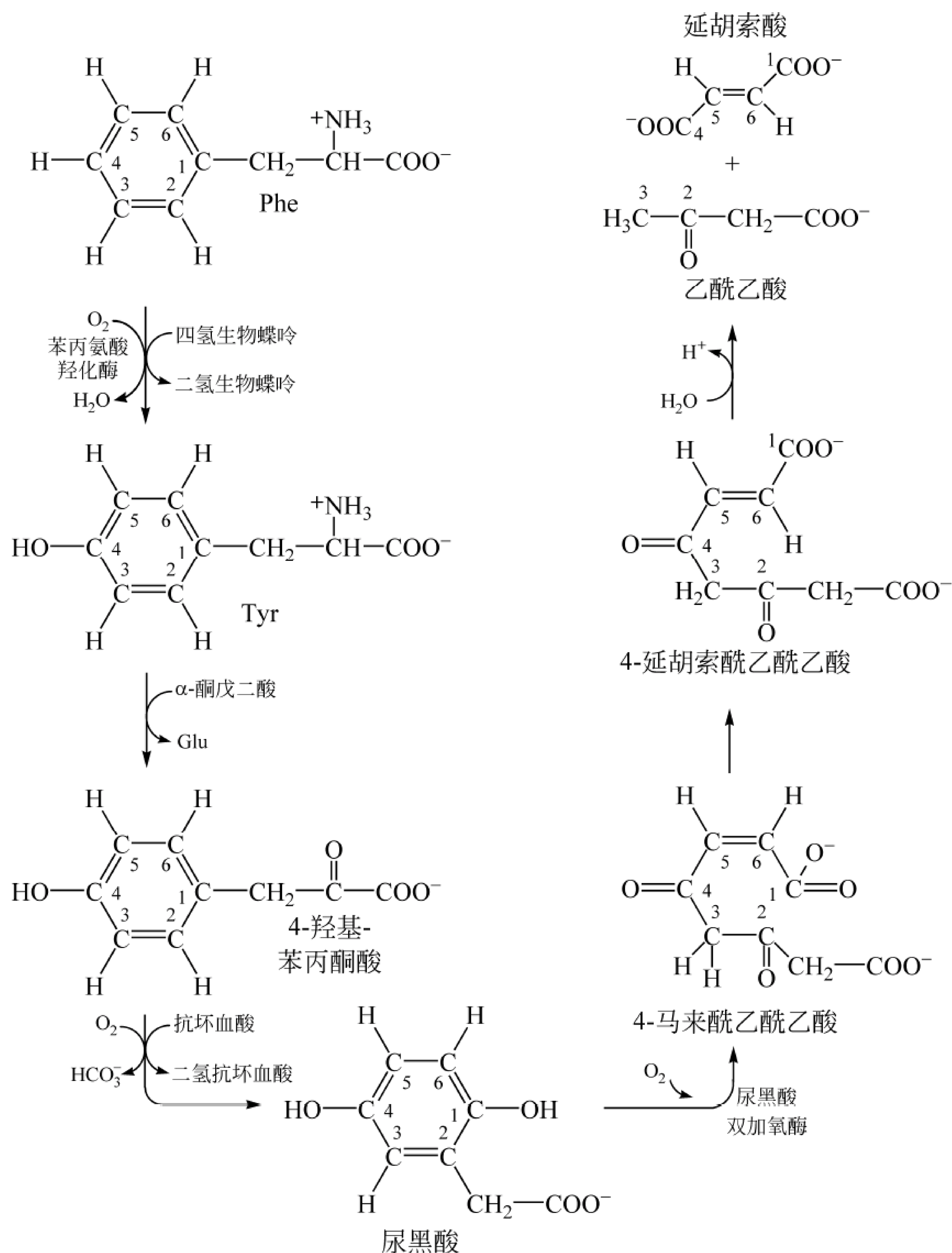


图 19.8 苯丙氨酸的降解途径

另外,缺乏尿黑酸双加氧酶(homogentisate dioxygenase)会导致代谢疾病尿黑酸尿(homogentisuria)。由于缺少尿黑酸双加氧酶造成尿黑酸(homogentisate)大量堆积,随尿排出,尿液在空气中放置时,由于尿黑酸转化为色素,尿液逐渐变黑,所以这种遗传缺陷病也由此得名尿黑酸尿。带有这种遗传缺陷的个体会导致关节炎,但现在还不能解释代谢缺陷是如何引起这一现象的。

19.3 氨基酸的生物合成

由于氨基酸是个含氮化合物,所以讨论氨基酸生物合成首先遇到的问题就是氮的来源。生物系统中的氮来自占大气 80%的气体 N_2。分子氮中的 2 个氮原子通过非常强的三

键(键能为940kJ/mol)紧密结合在一起。从化学角度讲,是极为稳定的键,反应性很差。所以,将氮整合到氨基酸或其他代谢衍生物中需要一个非常特殊的、复杂的酶系统。

图19.9是生物圈中含氮的主要化学物质相互转化的概图。N_2在氮氧化物、氨、含氮的生物分子之间的生物循环和返回到N_2的过程称为氮循环。通过氮循环,氮气被转化为可利用的形式,整合到简单的有机化合物中,然后再将氮转移到不同的低分子量的代谢物中,最终进入生物大分子中。

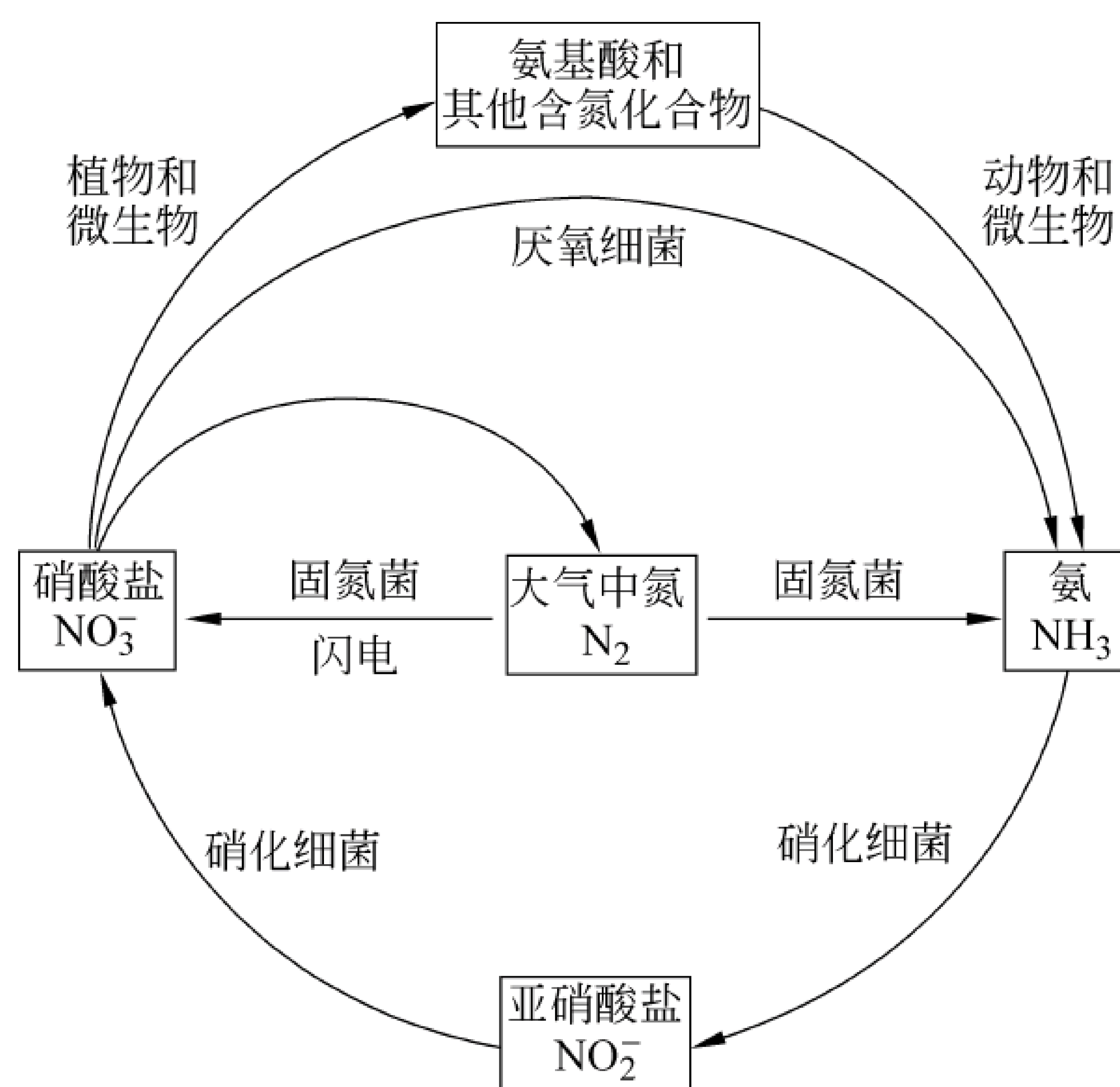


图19.9 氮循环

19.3.1 生物固氮

将N_2还原为氨称为固氮(nitrogen fixation)。在化学工业中是在高温和高压条件下,通过特殊的催化剂使N_2被H_2还原为氨,固定的氮用作植物的氮肥。生物圈中的大多数固氮工作都是靠少数几种能够合成复杂的固氮酶(nitrogenase)的微生物和藻类进行的。固氮酶是多亚基蛋白质,它可以催化1分子N_2转化为2分子的NH_3。

固氮酶存在于与许多植物,例如大豆、蚕豆、豌豆、苜蓿和红花草等豆科植物根瘤共生的根瘤菌(*Rhizobium*)和慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)中。N_2也可以被生活在土壤中的土壤杆菌(Agrobacteria)、固氮菌(*Azotobacter*)、克氏杆菌(*Klebsiella*)和梭菌属(*Clostridium*)细菌和生活在水环境中的蓝细菌属(*cyanobacteria*)细菌固定。大多数植物需要来自环境中已固定的氮,其中包括通过微生物分泌的、固定的和氧化的氮,以及腐烂的动植物组织分解和肥料提供的氮源。脊椎动物只能通过动植物组织的降解获得已固定的氮。

固氮酶是由两个蛋白成分组成,一个含有铁,另一个含有铁和钼。由于两个金属蛋白对O_2高度敏感,与氧接触就会失活,所以在固氮生物内,固氮酶都是与氧隔绝的。例如厌氧菌只有在无氧条件下才能进行固氮,在豆科的根瘤内,豆血红蛋白结合氧并使氧浓度在根瘤菌固氮酶直接作用的环境下保持在非常低的水平。

在固氮酶的作用下,N_2还原为NH_3,同时H^+也被还原为H_2:



$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

在体外通过固氮酶每转移1个电子就有2分子的ATP转化为ADP和P_i，因此1分子N_2的6个电子(加上$2H^+$的2个电子还原)还原就要消耗16个ATP。为了获得固氮所需要的还原力和ATP，共生固氮微生物依赖于与之共生的植物的光合作用。

一般认为固氮过程分为3步反应，每一步反应都有2个电子被转移，而且二亚胺和肼可能是维持与酶结合的反应中间物(图19.10)。

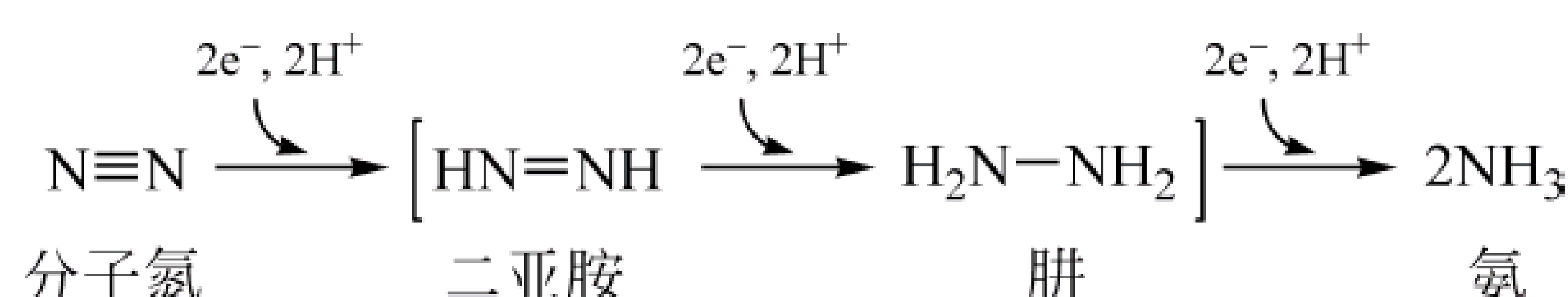


图19.10　固氮反应过程

另外，在闪电时，高压放电催化N_2的氧化，N_2与大气中的O_2反应生成生物可利用的硝酸盐和亚硝酸盐，同时随雨水进入土壤。NO^{-3}和NO^{-2}的其他来源是通过微生物(例如Nitrosomonas和nitrobacter)进行的NH_3氧化。大多数植物和微生物含有硝酸盐还原酶(nitrate reductase)和亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase)，它们催化氮氧化物还原为氨。在高等植物中，光合作用光反应中形成的还原型铁氧还蛋白可以将它的还原力转给NAD^+或$NADP^+$，生成NADH或NADPH。在硝酸盐还原酶的催化下，NADH或NADPH可以将硝酸盐转化为亚硝酸盐(图19.11)。

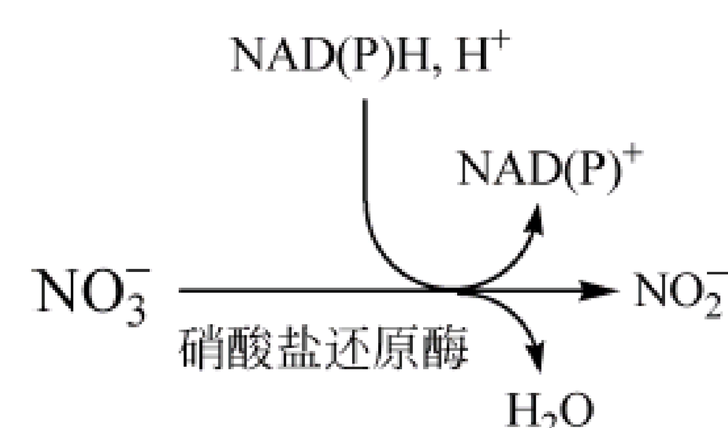


图19.11　硝酸盐还原酶反应

然后，在亚硝酸盐还原酶的催化下，亚硝酸盐被还原为NH_3，但反应的中间代谢物很难分离。反应的过程可能是



$$NO_2^- \rightarrow [NO^- \longrightarrow NH_2OH] \rightarrow NH_3$$

某些细菌可以将氨转化为亚硝酸盐，另外一些细菌可以将亚硝酸盐转化为硝酸盐。硝酸盐的形成称为硝化作用(nitrification)。也还有一些细菌可以将硝酸盐还原为亚硝酸盐或N_2(去硝化作用(denitrification))。

19.3.2　氨载体——谷氨酸和谷氨酰胺

由N_2或氮氧化物生物合成形成的氨可以整合到一些相对分子质量低的代谢物中。氨的pK值为9.2，因此在中性水溶液中，氨主要是以NH_4^+形式存在。在植物和动物中，α-酮戊二酸经谷氨酸脱氢酶催化可以接收氨基生成谷氨酸，就是前面提到的氧化脱氨的逆反应。



$$\alpha\text{-酮戊二酸} + NH_4^+ + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow \text{谷氨酸} + NAD(P)^+$$

另一个氨的重要载体是谷氨酰胺，经谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)催化氨整合到谷氨酸形成谷氨酰胺。



$$\text{谷氨酸} + NH_3 + ATP \longrightarrow \text{谷氨酰胺} + ADP + P_i$$

在许多生物合成反应中，谷氨酰胺是氮的供体，例如谷氨酰胺的酰胺氮就是核苷酸嘌呤和嘧啶环的几个氮原子的前体。哺乳动物中谷氨酰胺主要是在肌肉中合成，然后被转运到其他组织，例如肝和肾。

在原核生物和植物中，谷氨酰胺的酰胺氮通过谷氨酸合酶(glutamate synthase)催化可转移到α-酮戊二酸生成2分子谷氨酸，反应需要还原型辅酶NAD(P)H(图19.12)。

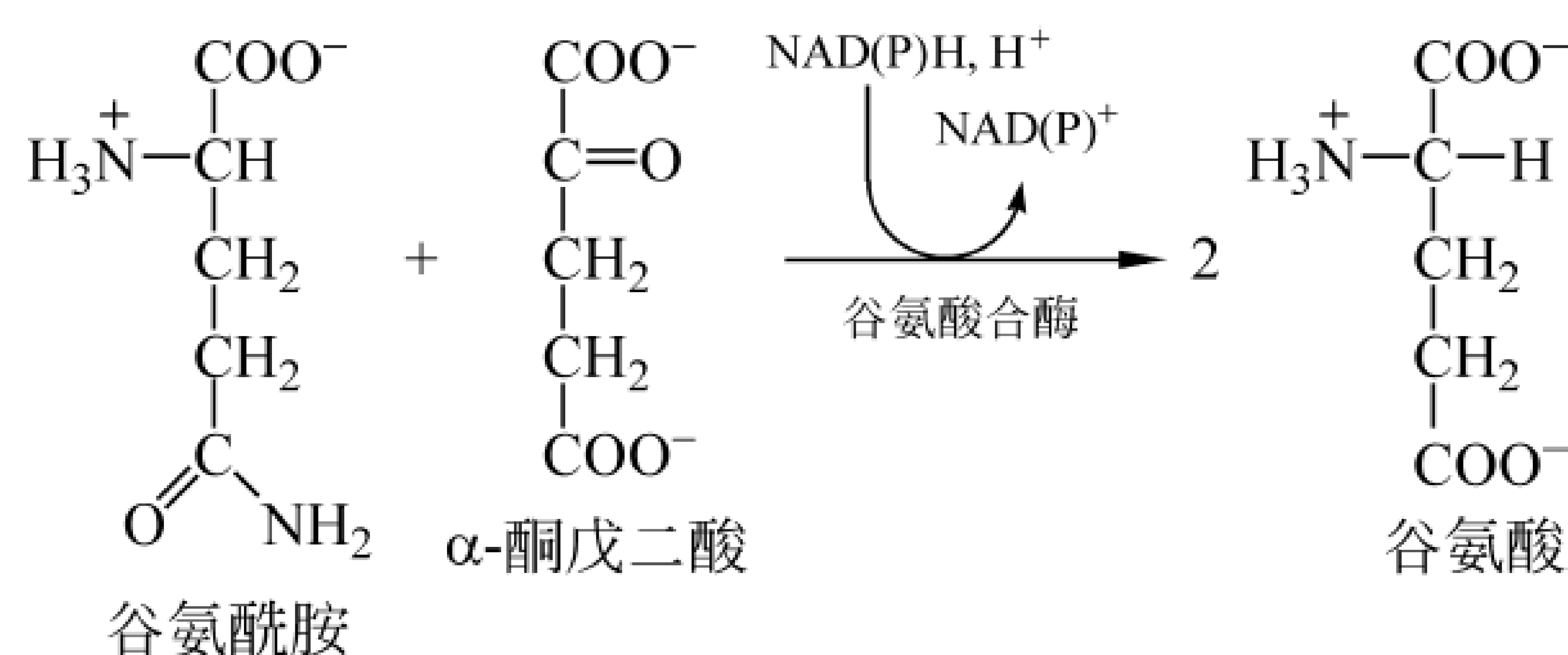


图 19.12　谷氨酸合酶催化的反应

原核生物在氨浓度低时常利用谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶的偶联反应将氨整合到谷氨酸中。图 19.13 给出了 2 个酶联合作用,再经转氨反应可以将氨转移到不同的 α-酮酸,生成相应的氨基酸。在大多数原核细胞中存在的氨浓度很低时,α-酮戊二酸经谷氨酰胺合成酶——谷氨酸合酶途径,而不是在谷氨酸脱氢酶催化下接收氨转换为谷氨酸,是因为在这种氨浓度低的情况下谷氨酰胺合成酶对 NH_3 的 K_m 远低于谷氨酸脱氢酶对 NH_4^+ 的 K_m。

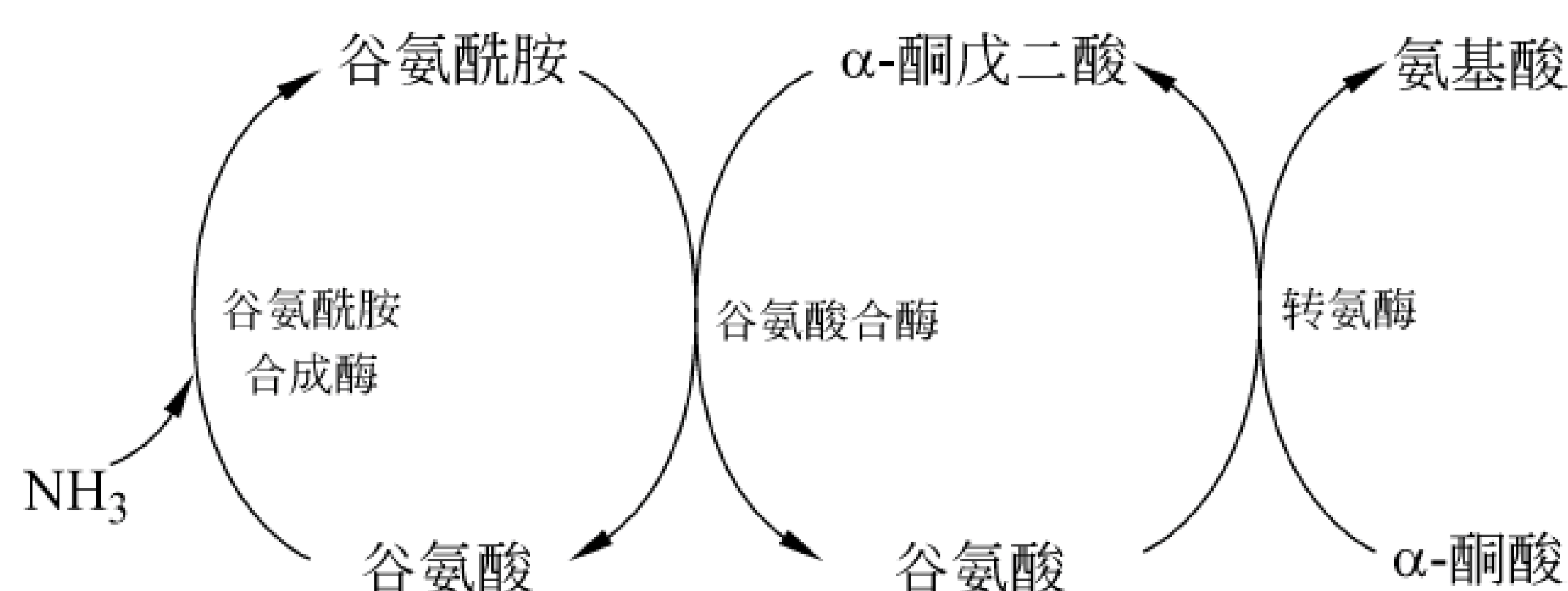


图 19.13　谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶联合作用

19.3.3　氨基酸的生物合成

氨基酸都可以由代谢中间产物进行合成,但本书中不准备详细讨论各个氨基酸的生物合成反应,图 19.14 按照生物合成途径将氨基酸生物合成分为 6 组:谷氨酸组、天冬氨酸组、丝氨酸组、丙酮酸组、芳香族氨基酸组和组氨酸组。

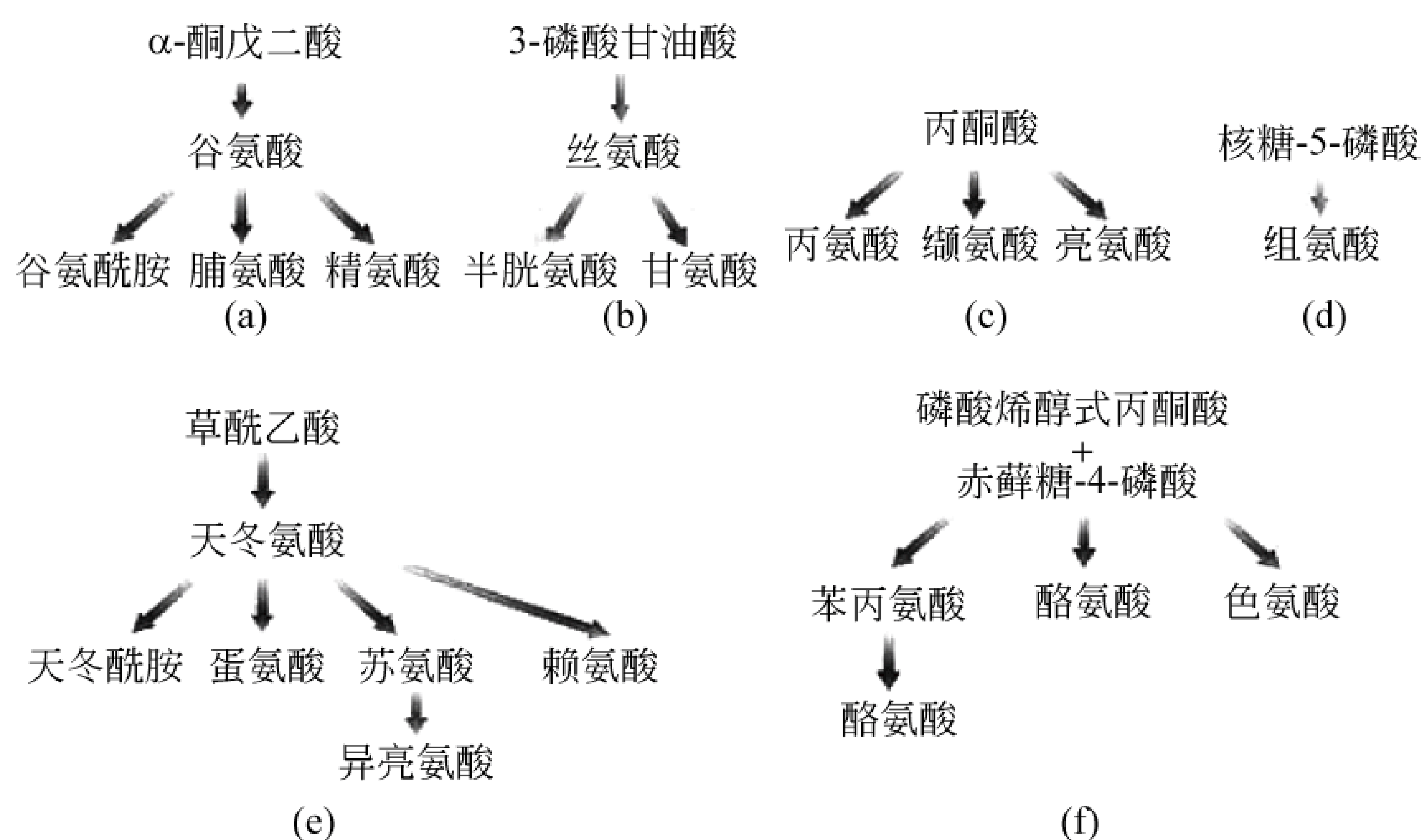


图 19.14　按照生物合成途径氨基酸合成分为 6 个组别

(a) 谷氨酸组;(b) 丝氨酸组;(c) 丙酮酸组;(d) 组氨酸组;(e) 天冬氨酸组;(f) 芳香族氨基酸组

从图 19.16 可以看出每一组都来自同一前体。但要记住，大多数细菌和植物能够合成所有的氨基酸。但哺乳动物只能合成一些非必需氨基酸，这些氨基酸一般都是糖酵解、戊糖磷酸途径以及柠檬酸循环的中间代谢物通过比较短的途径衍生来的，自己不能合成的必需氨基酸需要从食物中获得。

有 3 种氨基酸可以通过一步转氨反应合成，谷氨酸可以在谷氨酸脱氢酶催化下由 α-酮戊二酸和氨直接合成或通过转氨反应由 α-酮戊二酸接收来自另一个氨基酸的氨基生成。另外丙氨酸和天冬氨酸可由丙酮酸和草酰乙酸通过转氨反应生成。

19.4　生理活性胺和氧化氮(NO)的合成

除了氨基酸作为蛋白质的构件分子的作用以外，氨基酸还是许多特殊生物分子的前体，例如激素、辅酶、核苷酸、卟啉、一些胺类分子和氧化氮(NO)。本节简单介绍几种由氨基酸衍生的生理活性胺和氧化氮。

19.4.1　生理活性胺

一些氨基酸脱羧可以合成一些重要的神经递质和激素(图 19.15)。在脑中，谷氨酸脱羧生成 γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid，GABA)，是一种抑制性神经递质，GABA 合成不足会导致癫痫(羊角风)发作。组氨酸脱羧生成组胺，组胺具有控制血管的收缩以及胃分泌胃酸的作用。由色氨酸合成的 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine)，不仅是神经递质，而且也是某些非神经组织的激素。5-羟色胺有引起平滑肌收缩的作用。

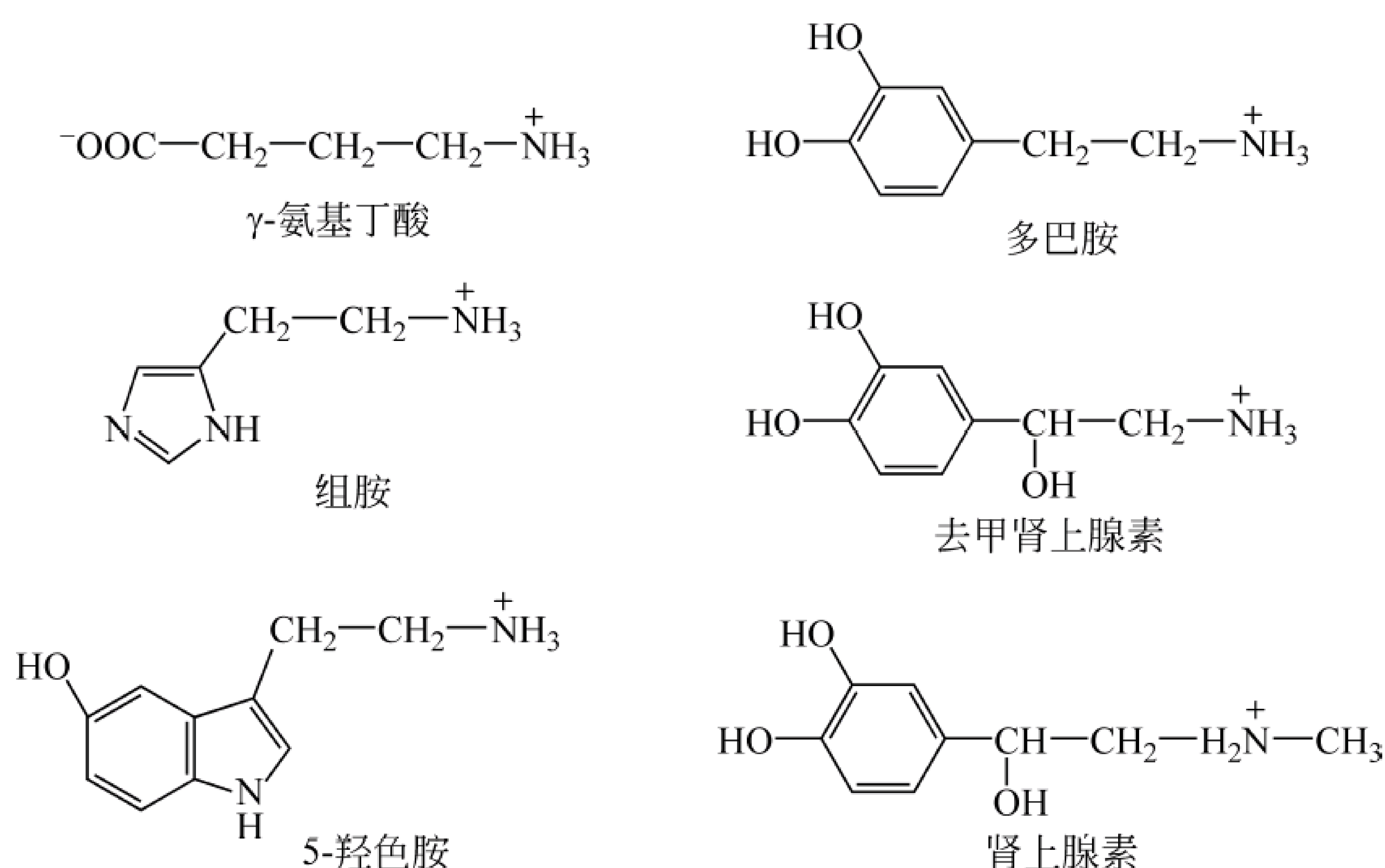


图 19.15　几种生理活性胺和激素

酪氨酸可依次转换为多巴(dopa)、多巴胺(dopamine)、去甲肾上腺素(norepinephrine)和肾上腺素(epinephrine)，这 4 种酪氨酸衍生物统称为儿茶酚胺(catecholamine)类物质。多巴胺合成不足会导致帕金森病(Parkinson's disease)，通过多巴胺给药治疗，病情可得到缓解。去甲肾上腺素和肾上腺素具有提高心率、促进糖原降解，使血糖升高的功能。

19.4.2 氧化氮(NO)

精氨酸在氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下可形成带有一个未配对电子的氧化氮(·N=O)和瓜氨酸(图 19.16)。反应需要辅助因子 NADPH、FMN、FAD、细胞色素 P450 和四氢生物蝶呤。氧化氮合酶存在于许多细胞中,如神经元、肝细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞、肾上皮细胞和巨噬细胞。

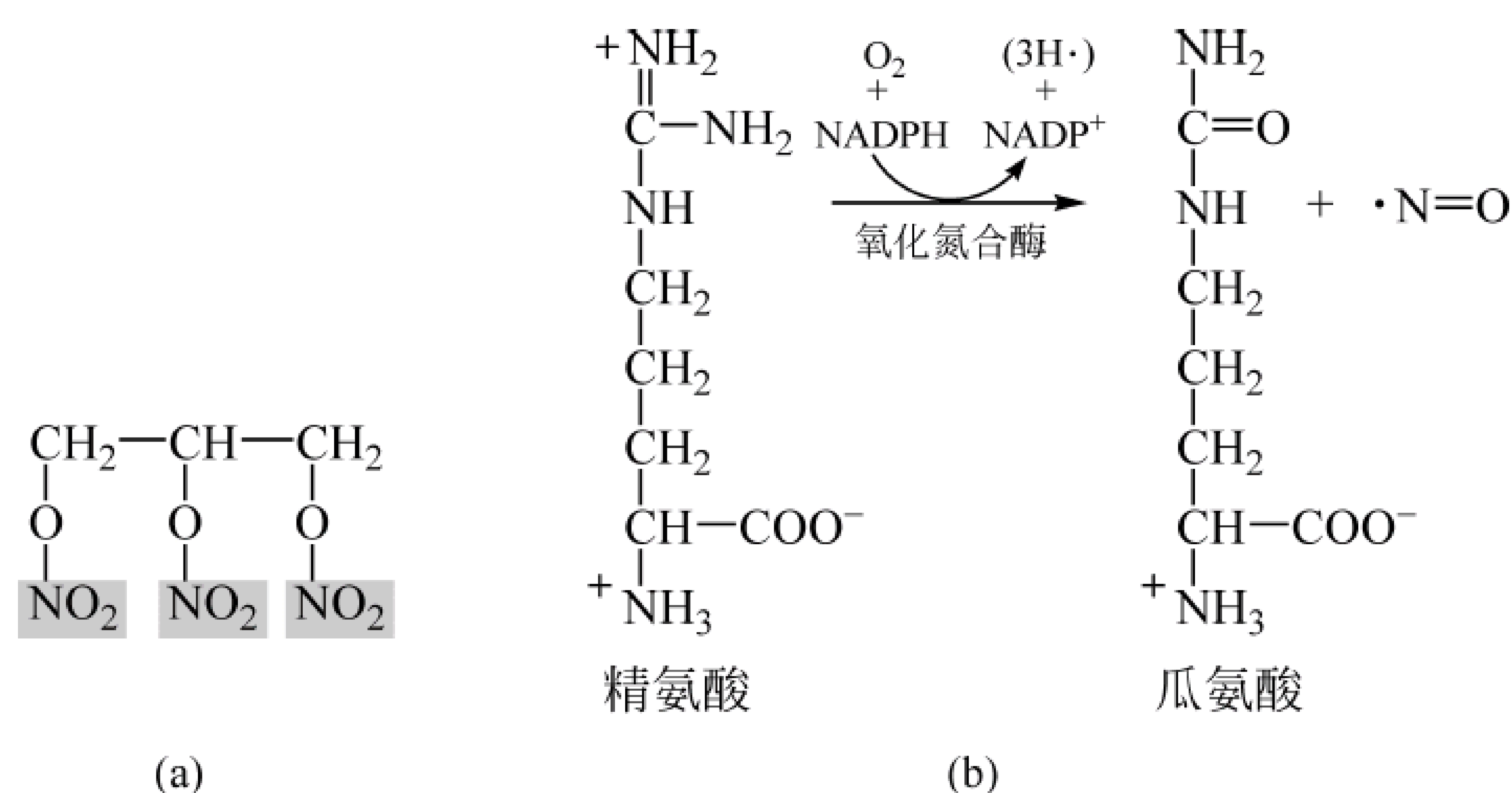


图 19.16 NO 的生物合成

(a) 硝化甘油;(b) NO 的生物合成,四氢生物蝶呤为辅酶

氧化氮是一个不稳定的气体分子,它能够从源细胞快速扩散到邻近细胞。由于在水溶液中快速与氧和水反应形成硝酸盐和亚硝酸盐,所以在体内仅存在几秒钟(1 至 5 秒)。氧化氮有许多功能,例如作为信息分子与鸟苷酸环化酶结合,促进 cGMP 的生成。还可作为"武器"被巨噬细胞用来杀死细菌和肿瘤细胞。而血管内皮细胞产生的氧化氮扩散到平滑肌细胞,可使血管舒张和血压降低,用于扩张冠状动脉的硝酸甘油在心绞痛治疗中就是凭借转化为氧化氮发挥作用的。

另外,在脑组织中氧化氮还具有神经递质的功能。脑卒中形成的氧化氮量异常高时有可能杀死某些神经元。动物实验表明服用氧化氮合酶抑制剂可降低脑卒中造成的脑损伤。

小结

1. 来自蛋白质降解或直接由食物获得的氨基酸都可被分解。分解代谢通常都是从脱氨开始的,剩下的碳链经修饰进入碳代谢的中心代谢途径。

2. 氨基酸降解途径可能生成丙酮酸、乙酰 CoA 或柠檬酸循环的中间物。可降解为柠檬酸循环中间物的氨基酸为生糖氨基酸。而那些形成乙酰 CoA 的氨基酸为生酮氨基酸。

3. 哺乳动物中大多数氮都是以尿素形式排泄的,尿素在肝内通过尿素循环生成。尿素中的碳原子来自于碳酸氢盐,一个氨基来自氨,而另一个来自天冬氨酸。

4. 少数细菌通过固氮酶将来自大气中 N_2 还原成氨而将氮固定。植物和微生物可以将硝酸盐和亚硝酸盐还原为氨。

5. 在谷氨酸脱氢酶作用下 α-酮戊二酸氨基化形成谷氨酸。在许多生物合成反应中谷氨酰胺作为氨的供体,它是在谷氨酰胺合成酶催化下由谷氨酸和氨合成的。

6. 谷氨酸的氨基在可逆的转氨反应中可以被转移给一个 α-酮酸，形成 α-酮戊二酸和相应的 α-氨基酸。氨基酸碳骨架的生物合成途径开始于简单的代谢前体，例如丙酮酸和柠檬酸循环的中间物。

7. 氨基酸作为前体可用于合成活性胺和氧化氮等一些具有生理活性的分子。

习题

1. 将^{15}N 标记的天冬氨酸饲喂动物，^{15}N 标记很快出现在许多其他氨基酸中，解释此现象。

2. 一位研究者在反应复合物中加入乳酸脱氢酶和 NADH 后，便可用分分光光度计来研究丙氨酸与 α-酮戊二酸之间的转氨作用。试问检测器测量的是什么？为什么这种测量方法可用于转氨作用的分析？

3. 动物肌肉利用两种机制排除氨基酸脱氨产生的过量氮，是哪两条途径？为什么必需这两条途径？

4. 许多生糖氨基酸可被降解成柠檬酸循环中间物，这些产物可增加循环的催化活性。细胞能否用这些氨基酸净合成葡萄糖呢？

5. 两组成年猫在禁食一个晚上以后，试验组喂以不含精氨酸的复合氨基酸食物。2 小时内血中氨浓度为正常值的 8 倍，此时猫表现出震颤、昏迷等氨中毒临床症状。对照组喂以完全氨基酸食物或以鸟氨酸取代精氨酸的氨基酸食物，则没有异常的临床症状。

(a) 在这个实验中实验猫为什么要先禁食一个晚上？

(b) 是什么因素使实验组氨的浓度上升？为什么精氨酸缺乏会导致氨中毒？精氨酸是否是猫的必需氨基酸？

(c) 为什么鸟氨酸能取代精氨酸？

6. 有的一两岁儿童的体重、智力等身体发育低于正常儿童，而且头发灰白，另外经常呕吐，特别是在饭后。经化验儿童尿液中的苯丙氨酸、苯丙酮酸高出正常值上百倍。

(a) 这种病症是由于哪种酶缺乏造成的？为什么尿液中苯丙氨酸浓度远高于正常值？对于这样病人，提出你认为的最好治疗方法。

(b) 为什么病人的头发会呈灰白色？

(c) 为什么苯丙酮尿症患者要避免食用含阿斯巴甜的食物和饮料？(提示：阿斯巴甜分子结构是天冬氨酰苯丙氨酸甲酯)。

7. 如果给一只鼠喂食含有^{15}N 标记的 Ala，鼠分泌出的尿素氮是否变成了^{15}N 标记的？如果是的话，尿素中的一个氨基被标记，还是 2 个氨基都被标记？说明理由。

8. 催化尿素循环反应的酶的产量可以根据有机体代谢的需要增加或减少。这些酶的高水平与高蛋白饮食和饥饿都相关联。请解释这种似乎矛盾的现象。

9. 一个成人每天的能量需求约 10 000kJ。已知蛋白质中氮含量占 16.0%。如果人每天排出的尿中含有 40.0g 尿素，试问人体每天的蛋白质摄入量是多少？如果每克蛋白质可提供 14.0kJ 能量，计算蛋白质提供的能量占人体能量总需求的百分率。

10. 正常人体血浆中含有人体蛋白质合成所需的所有氨基酸，但浓度并不相同，其中丙氨酸和谷氨酰胺比其他任何氨基酸的浓度要高得多，请给出解释。

20　核苷酸代谢

核苷酸生物合成存在着两条途径：从头合成途径(de novo synthesis pathway)和补救途径(salvage pathway)。从头合成途径是由简单的前体分子(例如氨基酸、CO_2 和 NH_3 等分子)生物合成核苷酸的杂环碱基的途径。补救途径是一条省能、简单的核苷酸生物合成途径，碱基不用从头合成，而是直接利用细胞内或饮食中核苷酸降解生成的完整嘌呤和嘧啶碱基，实际上是核苷酸降解产物重新形成核苷酸的过程。从头合成途径和补救途径在细胞代谢中都很重要。

核苷酸的降解主要是嘌呤和嘧啶碱基的降解过程，嘌呤降解生成可以排泄的、有潜在毒性的化合物，而嘧啶降解生成容易代谢的产物。

20.1　嘌呤核苷酸的合成

核苷酸生物合成都是先合成单磷酸核苷酸，各种嘌呤类核苷酸的前体是次黄嘌呤核苷酸(inosine monophosphate，IMP)，或称为肌苷酸；而各种嘧啶核苷酸则是从尿嘧啶核苷酸(UMP)衍生来的。IMP 和 UMP 的从头合成实际上是次黄嘌呤碱基和尿嘧啶碱基的合成。

IMP 是在核糖-5-磷酸基础上合成次黄嘌呤环结构，而 UMP 则是先合成尿嘧啶碱基，然后再连接核糖-5-磷酸。但无论哪种连接方式，使用的都是核糖-5-磷酸的活化形式 5-磷酸核糖-α-焦磷酸(5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate，PRPP)。PRPP 是在核糖-5-磷酸焦磷酸激酶(ribose-5-phosphate pyrophokinase)催化下由核糖-5-磷酸和 ATP 合成的(图 20.1)。

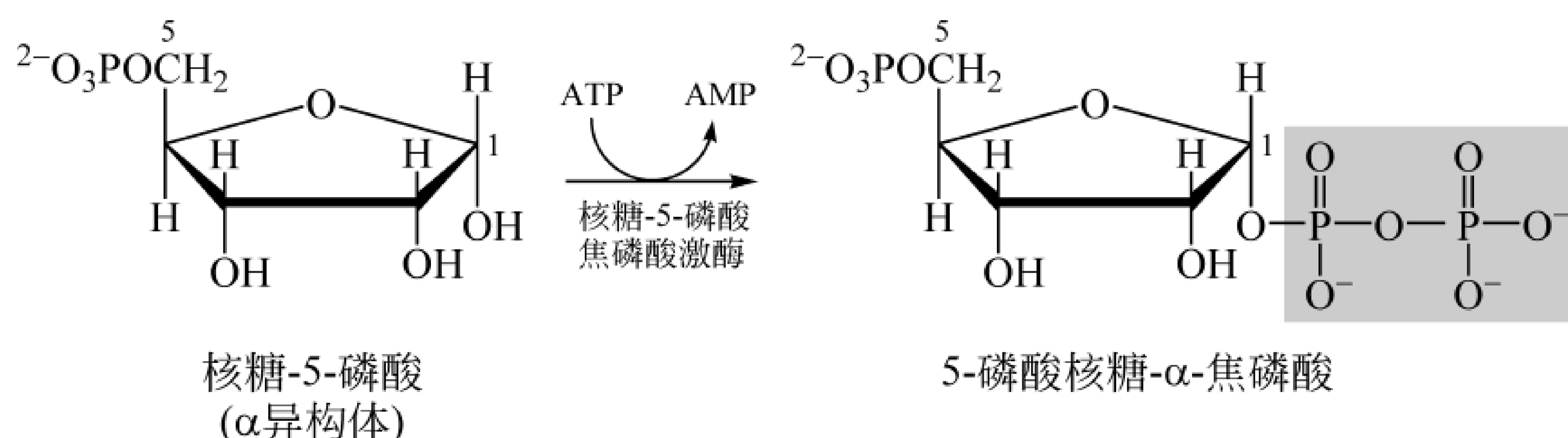


图 20.1　5-磷酸核糖-α-焦磷酸(PRPP)的合成

嘌呤核苷酸的合成首先要了解的是嘌呤环上原子的来源。1948 年 John M. Buchanan 等在鸽子的食物中掺入一些简单的核素标记化合物，如$^{13}CO_2$、$H^{13}COO^-$（甲酸）和$^+H_3N—CH_2—^{13}COO^-$（甘氨酸），然后从鸽子的粪便中分离和化学降解鸽子排泄的尿酸，追踪标记的碳和氮原子在尿酸分子中的位置，发现来自$^{13}CO_2$ 的碳原子整合在尿酸的 C-6 位，而来自甲酸的碳占据 C-2 和 C-8 位，由此获得了嘌呤核苷酸合成的第一个线索。

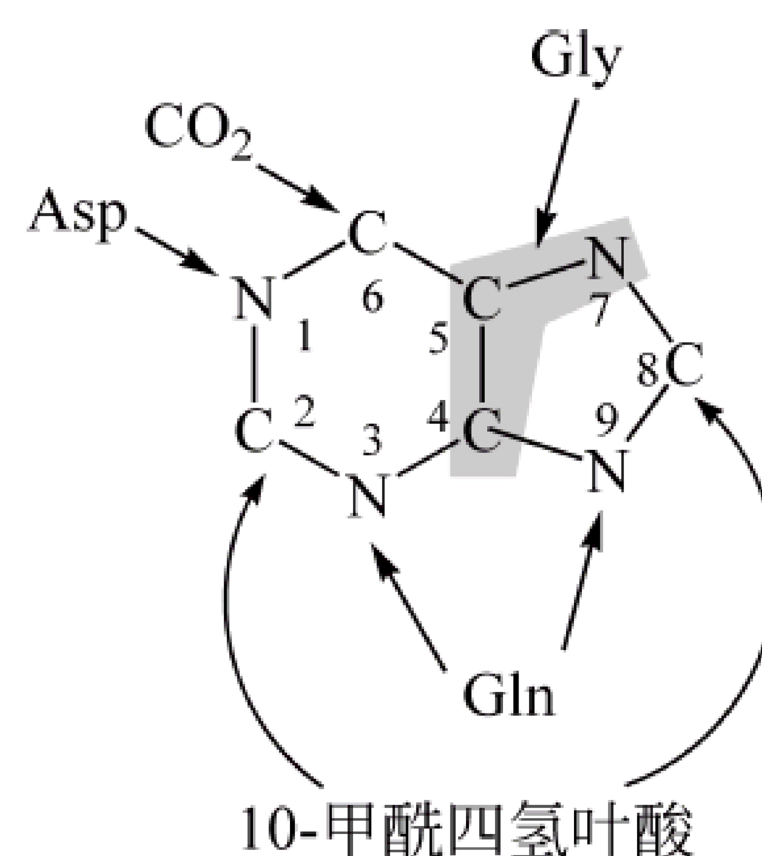


图 20.2　嘌呤环上各个原子的来源

通过核素标记示踪实验，最后嘌呤环上原子的来源都被确定下来（图 20.2）：N-1 来自天冬氨酸；C-2 和 C-8 来自甲酸（通过 10-甲酰四氢叶酸）；N-3 和 N-9 来自谷氨酰胺的酰胺基；C-4、C-5 和 N-7 都来自甘氨酸；C-6 来自 CO_2。

20.1.1　次黄嘌呤核苷酸的合成

Buchanan 和 Greenberg 使用从鸽子和鸡肝中纯化的酶，证实嘌呤核苷酸从头合成开始于 PRPP，产物是次黄嘌呤核苷酸，其他各种嘌呤核苷酸都是次黄嘌呤核苷酸的衍生物。图 20.3 给出了次黄嘌呤核苷酸从头合成途径，反应用酶都位于胞质溶胶中，共涉及 10 步反应。

下面按照图 20.3 中给出的反应序号，对各步反应进行简单说明。

① 合成嘌呤 N-9：PRPP 接收来自 Gln 提供的酰胺氮生成 β-5-磷酸核糖胺，获得嘌呤 N-9 原子。值得注意的是，核糖的异头碳构型在亲核取代过程中由 α 构型转换成了 β 构型，形成的是 β 构型的 5-磷酸核糖胺。这种 β 构型一直保留在合成的嘌呤核苷酸中。

② 合成嘌呤 C-4、C-5 和 N-7：β-5-磷酸核糖胺与甘氨酸形成甘氨酰胺核苷酸，获得嘌呤 C-4、C-5 和 N-7 原子。

③ 合成嘌呤 C-8：一个甲酰基从 10-甲酰四氢叶酸转移到甘氨酰胺核苷酸的氨基上，形成甲酰甘氨酰胺核苷酸，获得嘌呤 C-8 原子。

④ 合成嘌呤 N-3：甲酰甘氨酰胺核苷酸接收来自谷氨酰胺的酰胺生成甲酰甘氨脒核苷酸，获得嘌呤 N-3。反应与 ATP 水解反应偶联。

⑤ 形成嘌呤咪唑环：甲酰甘氨脒核苷酸发生闭环反应，形成一个咪唑衍生物-甘氨咪唑核苷酸，形成嘌呤咪唑环。反应与 ATP 水解反应偶联。

⑥ 合成嘌呤 C-6：氨基咪唑核苷酸以 HCO_3^- 形式接收 CO_2，生成氨基咪唑羧酸核苷酸，获得嘌呤 C-6 原子。反应与 ATP 水解反应偶联。

⑦ 合成嘌呤 N-1：氨基咪唑羧酸核苷酸与天冬氨酸缩合生成氨基咪唑琥珀酰基氨甲酰核苷酸，获得嘌呤 N-1 原子。反应与 ATP 水解反应偶联。

⑧ 生成氨基咪唑氨甲酰核苷酸：氨基咪唑琥珀酰基氨甲酰核苷酸释放出延胡索酸，生成氨基咪唑氨甲酰核苷酸。

⑨ 合成嘌呤 C-2：氨基咪唑氨甲酰核苷酸接收 10-甲酰四氢叶酸提供的甲酰基，生成甲酰氨基咪唑氨甲酰核苷酸，获得嘌呤 C-2 原子。

⑩ 生成 IMP：甲酰氨基咪唑氨甲酰核苷酸环化生成 IMP。至此，完成了 IMP 整个嘌呤环的合成。

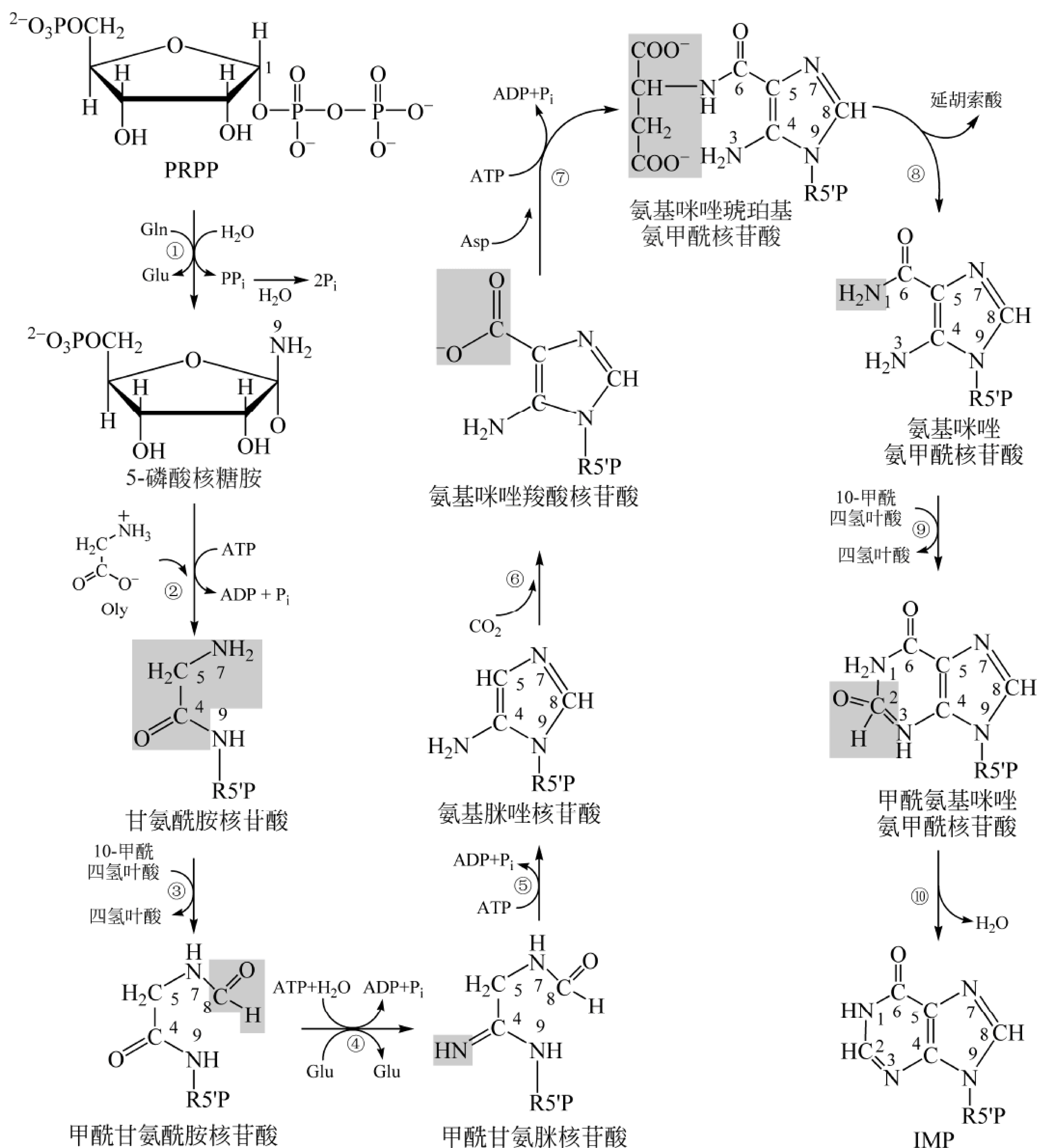


图 20.3　次黄嘌呤核苷酸的从头合成

催化各步反应的酶：① 谷氨酰胺-PRPP 转酰胺酶；② 甘氨酰胺核苷酸合成酶；③ 甘氨酰胺核苷酸转甲酰基酶；④ 甲酰甘氨脒核苷酸合成酶；⑤ 氨基咪唑核苷酸合成酶；⑥ 氨基咪唑核苷酸羧化酶；⑦ 氨基咪唑琥珀酰基氨甲酰核苷酸合成酶；⑧ 腺苷酸基琥珀酸裂解酶；⑨ 氨基咪唑氨甲酰核苷酸转甲酰基酶；⑩ IMP 环化水解酶

IMP 的从头合成消耗了大量的能量。在合成 PRPP 时，ATP 转换为 AMP，第②、④、⑤和⑦步反应也是通过 ATP 转换为 ADP 驱动的，另外由谷氨酸和氨合成谷氨酰胺也需要 ATP。

20.1.2 AMP 和 GMP 的合成

合成的 IMP 可以转换成主要的嘌呤核苷酸 AMP 或 GMP(图 20.4)。每个转换途径都需要两步酶促反应。

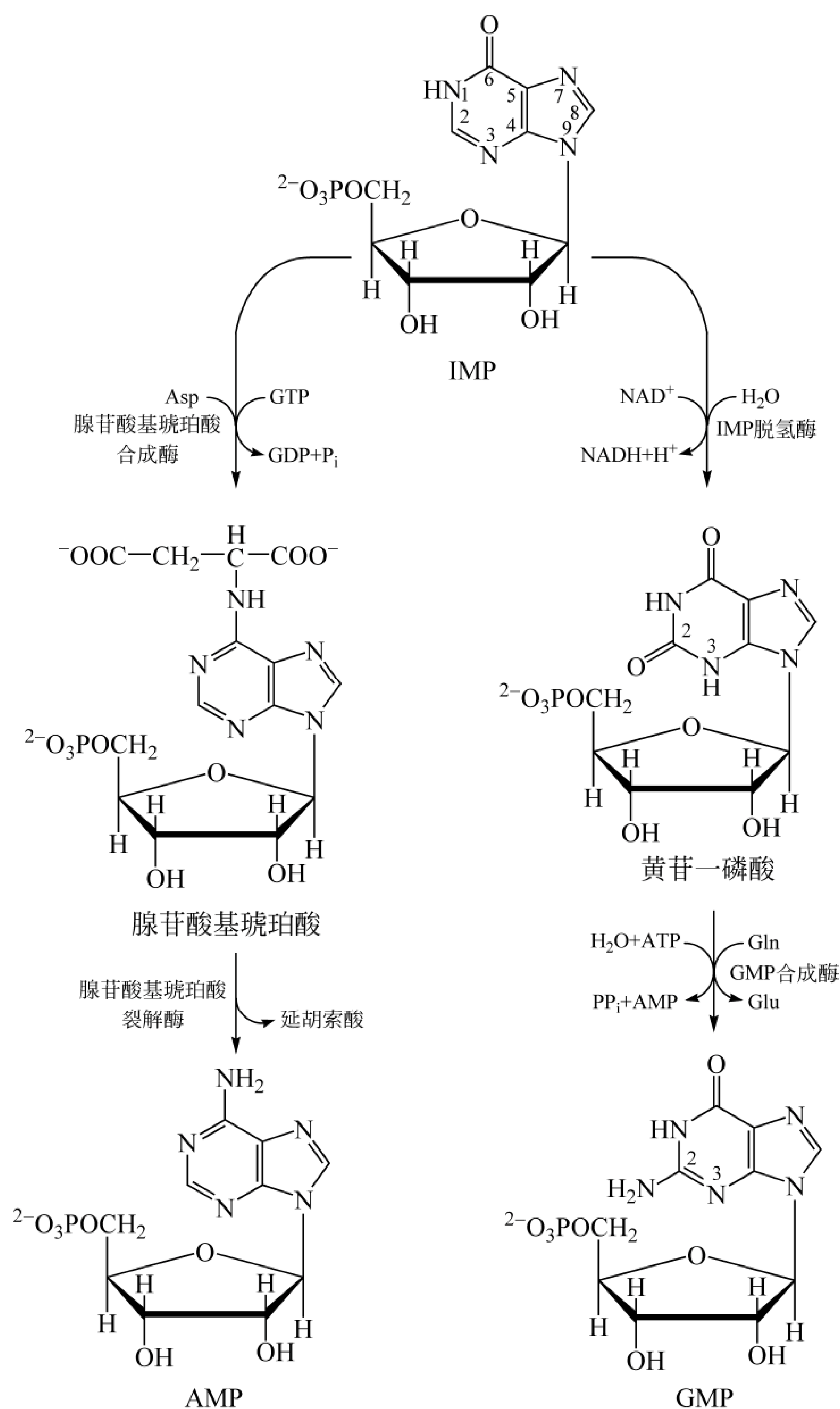


图 20.4 IMP 转换为 AMP 或 GMP 的途径

在由 IMP 生成 AMP 的过程中,首先是天冬氨酸的氨基与 IMP 中的羰基缩合形成腺苷酸基琥珀酸,反应的能量来自 GTP,由腺苷酸基琥珀酸合成酶(adenylosuccinate synthetase)催化。然后腺苷酸基琥珀酸在腺苷酸基琥珀酸裂解酶(adenylosuccinate lyase)

的作用下除去延胡索酸,生成AMP。

在由IMP转换成GMP的过程中,首先在次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMP dehydrogenase)催化下,IMP的C-2与N-3之间双键加水,该水化产物被NAD^+氧化,生成黄嘌呤核苷酸(xanthosine monophosphate, XMP)。然后在鸟嘌呤核苷酸合成酶(GMP synthetase)催化下,谷氨酰胺的酰胺氮取代XMP中C-2位的氧生成GMP,ATP水解为AMP和焦磷酸驱动反应进行。反应是不可逆的,一旦形成GMP,GMP就不能转换成IMP或AMP。

IMP转换为GMP是IMP利用的一个重要的关卡。由IMP合成AMP消耗的是GTP,而由IMP合成GMP消耗的是ATP,这有助于平衡两种产物的生成。AMP和GMP不能直接相互转换。

细胞内的嘌呤核苷酸合成受到反馈调控。如图20.5所示,嘌呤核苷酸生物合成的调控部位之一核糖-5-磷酸焦磷酸激酶受嘌呤核苷酸AMP和GMP等几种嘌呤核苷酸的反馈抑制。而另一个调控部位,也是最主要的调控部位是谷氨酰胺-PRPP转酰胺酶,它受到AMP和GMP等核苷酸的别构抑制。

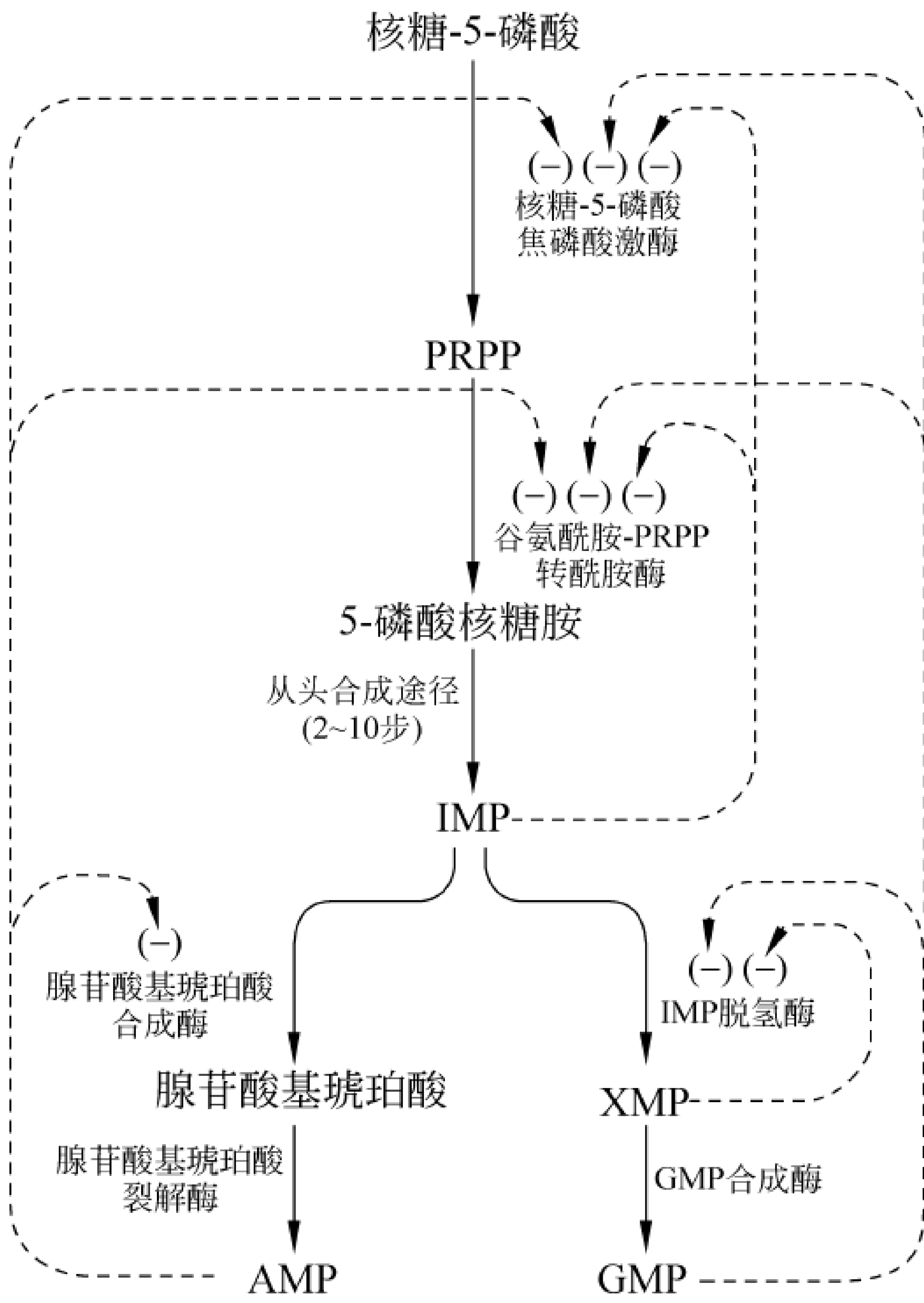


图20.5 嘌呤核苷酸合成的调控

由IMP形成AMP或GMP时也受到AMP或GMP的反馈抑制。腺苷酸基琥珀酸合成酶在体外实验中受到AMP的抑制,IMP脱氢酶受到黄嘌呤核苷酸和GMP的抑制。

20.1.3 补救途径

在细胞代谢和食物消化过程中,核酸可降解为核苷酸、核苷和碱基(图20.6)。降解形成的一部分嘌呤和嘧啶可以进一步降解生成尿酸或其他排泄产物,但大部分嘌呤可通

过直接转换为嘌呤核苷酸中的嘌呤而被回收，这种核苷酸合成途径称为补救途径。完整的嘌呤再循环利用可节省细胞能量。嘧啶也可被细菌和少数动物回收重新用于合成嘧啶核苷酸。

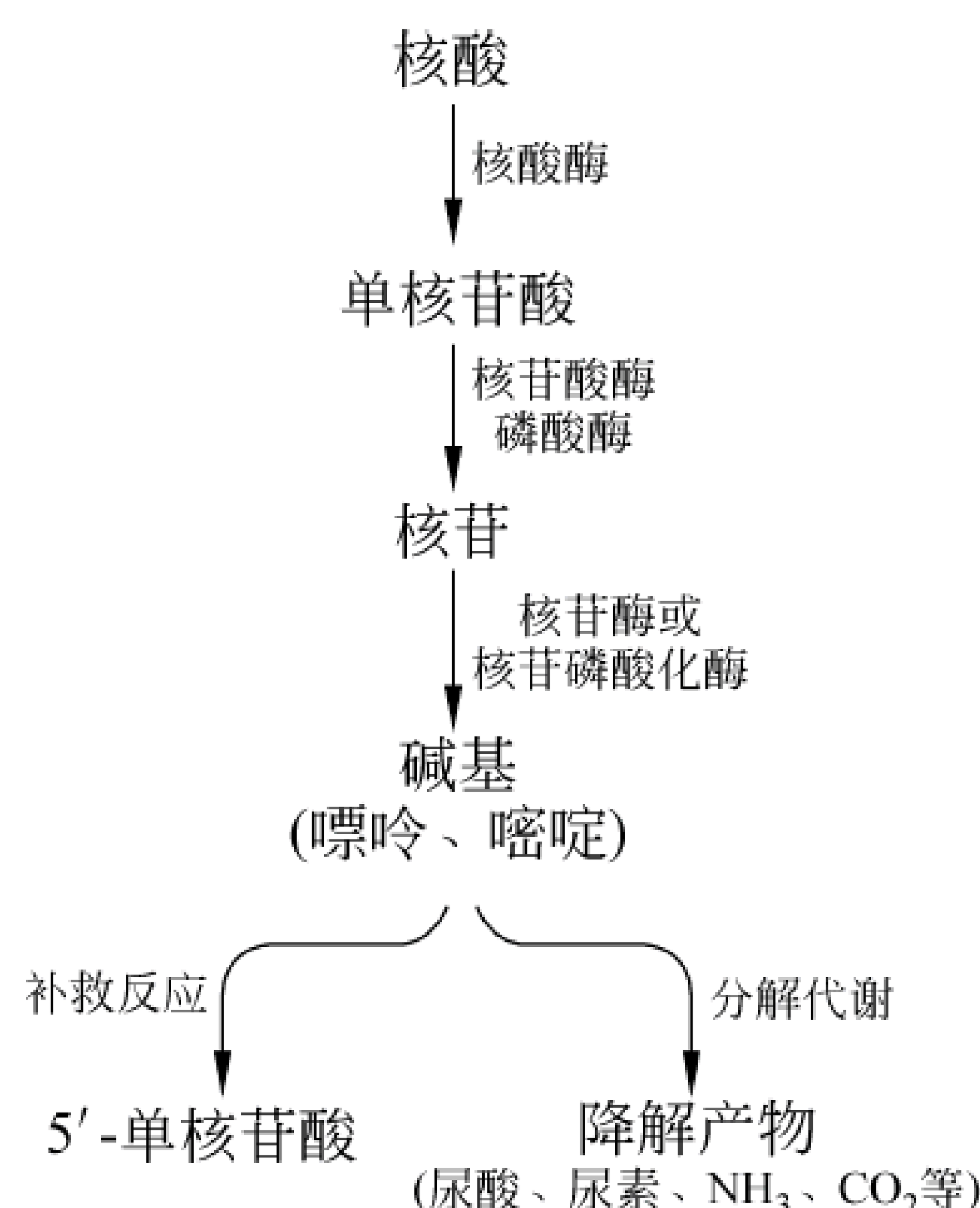


图 20.6 核酸降解

图 20.7 为嘌呤的降解和补救反应的简图。PRPP 为补救反应的核糖-5-磷酸的供体。腺嘌呤磷酸核糖转移酶(adenine phosphoribosyl-transferase，APRT)催化腺嘌呤与 PRPP 形成 AMP 和 PP_i。次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase，HGPRT)既可以催化次黄嘌呤与 PRPP 形成 IMP 和 PP_i，也可以催化鸟嘌呤与 PRPP 形成 GMP 和 PP_i。上述 3 个反应中生成的 PP_i 经焦磷酸酶水解，都使得反应变成不可逆。

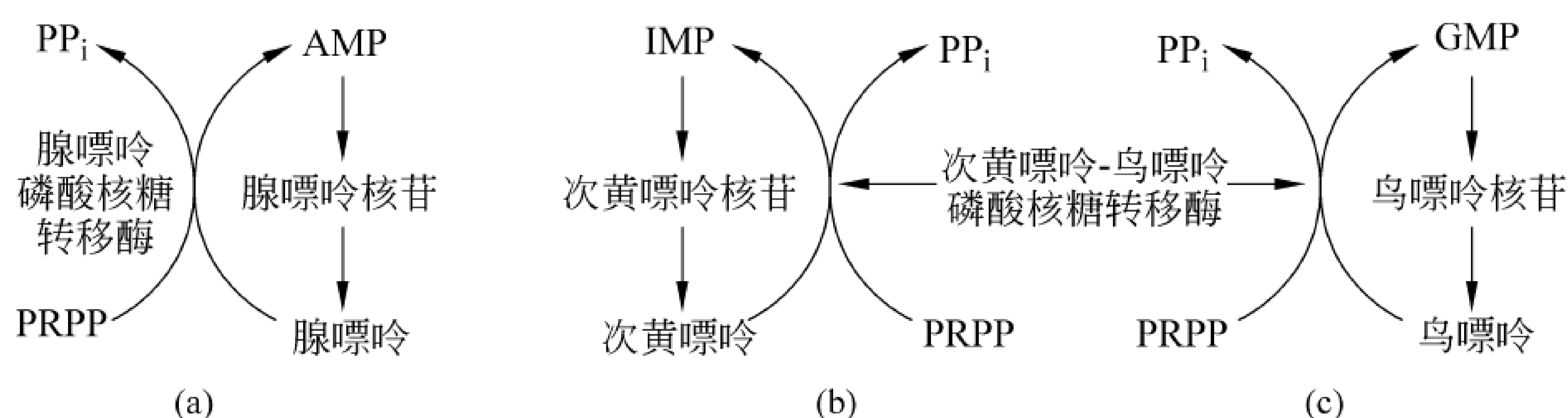


图 20.7 嘌呤的降解和再循环利用

(a) 腺嘌呤磷酸核糖转移酶催化腺嘌呤与 PRPP 生成 AMP 的补救反应；(b) 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶催化次黄嘌呤与 PRPP 生成 IMP 的补救反应；(c) 鸟嘌呤与 PRPP 生成 GMP 的补救反应

次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶对 PRPP 的 K_m 值比谷氨酰胺-PRPP 转酰胺酶对 PRPP 的 K_m 值低，就是说次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶对 PRPP 的亲和力大，同时该酶还具有高的 k_{cat}。这些特性使得在低浓度的 PRPP 条件下，补救途径反应比从头合成途径反应优先发生。

次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶遗传缺陷会引起一种称为 Lesch-Nyhan 综合征的严重的代谢病，其特征是智力迟钝、痉挛，表现出强制性的自残行为，甚至自毁容貌，该病症也

称为自毁容貌症。该病主要的生物化学特征是排泄的尿酸量可达到正常排泄尿酸量的6倍,同时嘌呤从头合成的速率大大增加。

这是由于患者缺少次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性,次黄嘌呤和鸟嘌呤不能转换成IMP和GMP,而是降解为尿酸的缘故。但缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的细胞含有高浓度的PRPP,通常用于次黄嘌呤和鸟嘌呤补救途径的PRPP都提供给IMP的从头合成途径,生成的过量IMP又会形成尿酸,体内过量的尿酸就会引起Lesch-Nyhan综合征。

20.2 嘧啶核苷酸的合成

嘧啶核苷酸的从头合成途径比嘌呤从头合成途径简单,并且消耗的ATP少。核素实验表明嘧啶环中的原子来自3个前体(图20.8):C-2来自HCO_3^-;N-3来自谷氨酰胺的酰胺基团;其余原子都来自天冬氨酸。

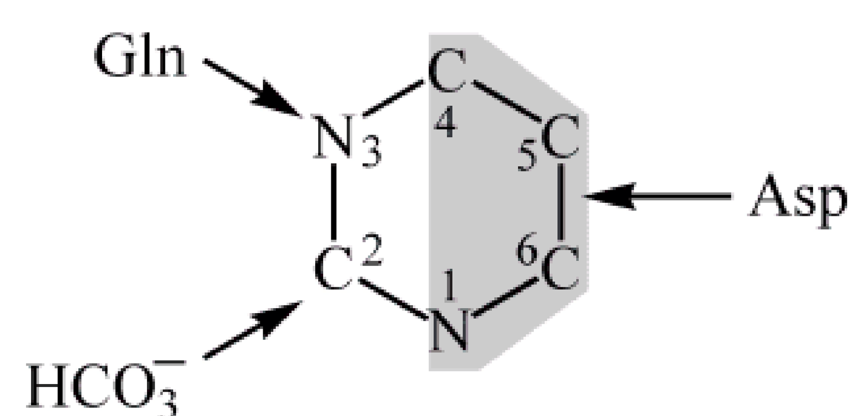


图20.8 从头合成的嘧啶环中原子的来源

20.2.1 UMP的合成

所有嘧啶核苷酸生物合成的前体都是UMP。嘧啶核苷酸生物合成也需要PRPP,但并不像嘌呤核苷酸合成那样以PRPP作为嘌呤核苷酸合成的基础第一步反应就需要它,而是首先合成嘧啶环,然后带有嘧啶环的化合物乳清酸再与PRPP反应形成嘧啶核苷酸。整个UMP的从头合成途径共涉及6步反应,催化反应的酶都位于胞质溶胶中(图20.9)。

下面按照图20.9给出的反应序号,对各步反应进行简单说明。

① 合成氨甲酰磷酸:在氨甲酰磷酸合成酶Ⅱ(carbamoyl phosphate synthetase Ⅱ,CPS Ⅱ)催化下,由谷氨酰胺的酰胺氮、HCO_3^-和ATP的磷酰基团生成氨甲酰磷酸。反应需要两分子ATP。

② 合成氨甲酰天冬氨酸:在天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)催化下,激活的氨甲酰磷酸的氨甲酰基被转移给天冬氨酸生成氨甲酰天冬氨酸。

③ 闭环生成二氢乳清酸:在二氢乳清酸酶(dihydroorotase)催化下,氨甲酰天冬氨酸环化生成*L*-二氢乳清酸。

④ 乳清酸氧化:在二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase)催化下,*L*-二氢乳清酸经氧化生成乳清酸,辅助因子为辅酶Q。至此,嘧啶环已经形成。

⑤ 获得PRPP:在乳清酸磷酸核糖转移酶(orotate phosphoribosyl transferase)催化下,乳清酸与PRPP反应生成乳清苷-5′-一磷酸。

⑥ 生成尿嘧啶核苷酸(UMP):在乳清苷-5′-一磷酸脱羧酶(orotidine-5′-monophosphate decarboxylase)催化下,乳清苷-5′-一磷酸脱羧生成UMP。

在细菌中,UMP合成涉及6种独立的酶,而在动物中催化①、②和③步反应的酶是一条具有氨甲酰磷酸合成酶Ⅱ、ATCase和二氢乳清酸酶活性的多功能肽链。

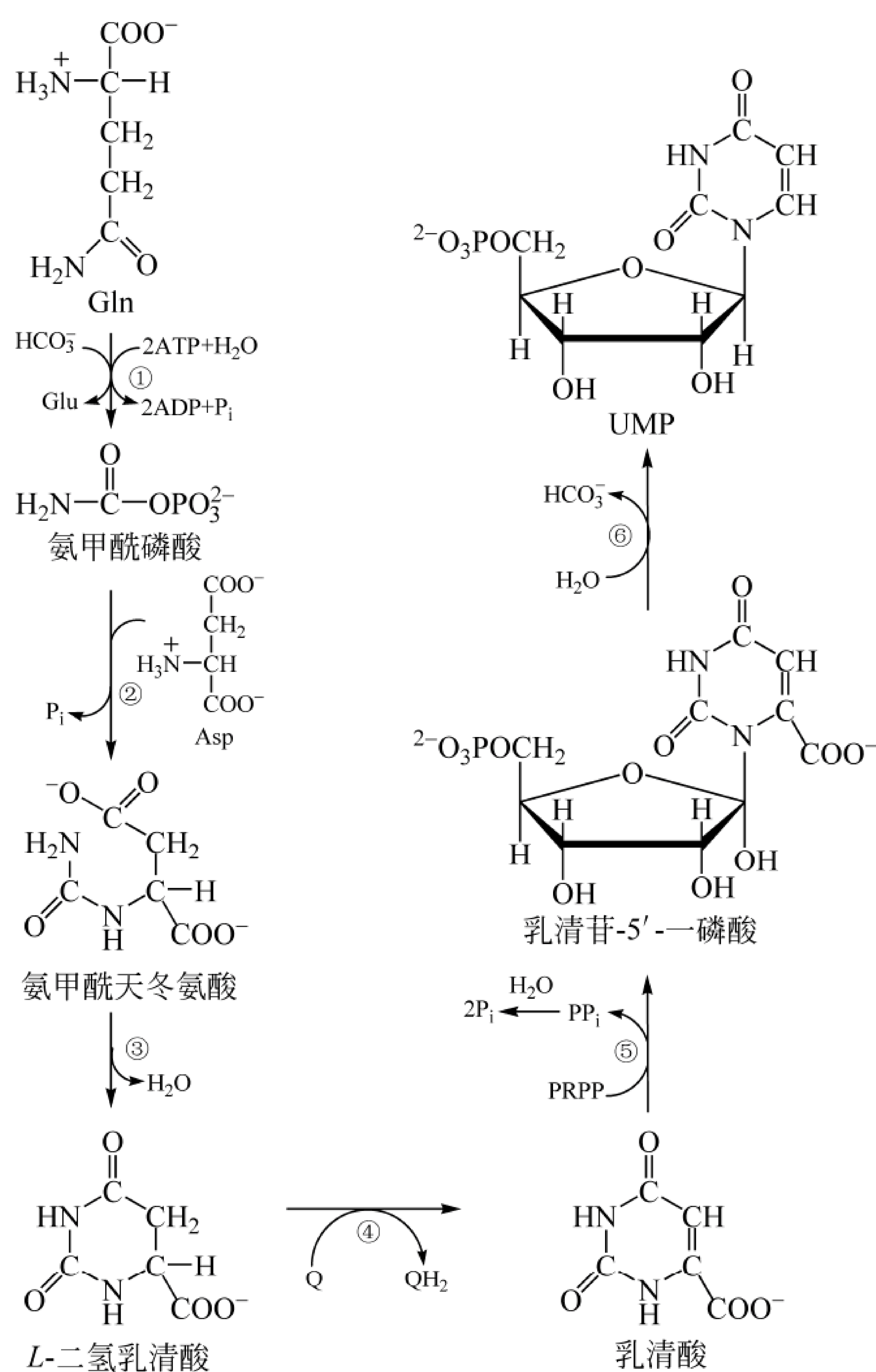
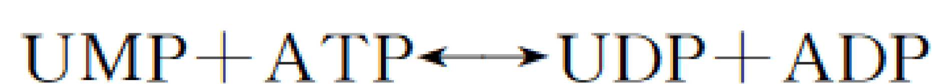


图 20.9　嘧啶核苷酸的从头合成途径

催化各步反应的酶：① 氨甲酰磷酸合成酶Ⅱ；② 天冬氨酸转氨甲酰酶；③ 二氢乳清酸酶；④ 二氢乳清酸脱氢酶；⑤ 乳清酸磷酸核糖转移酶；⑥ 乳清苷-5′-一磷酸脱羧酶

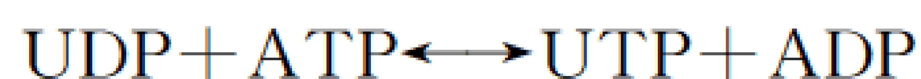
20.2.2　CTP 的合成

由 UMP 可以合成 CTP，涉及 3 步反应。首先在核苷单磷酸激酶(nucleoside monophosphate)催化下，ATP 的 γ-磷酸转移给 UMP 形成 UDP。



$$UMP + ATP \longleftrightarrow UDP + ADP$$

然后，在核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphate kinase)催化下，由 UDP 形成 UTP。



$$UDP + ATP \longleftrightarrow UTP + ADP$$

最后在 CTP 合成酶(CTP synthetase)催化下，UTP 的 6 位氨基化生成 CTP(图 20.10)。

在细菌的嘧啶生物合成中 ATCase 受到别构调控。如 *E. coli* 中 ATCase 受到终产物

CTP的反馈抑制,而ATP是ATCase的别构激活剂,两者竞争共同的别构部位。而在许多细菌中不是CTP,而是UTP作为ATCase的反馈抑制剂。

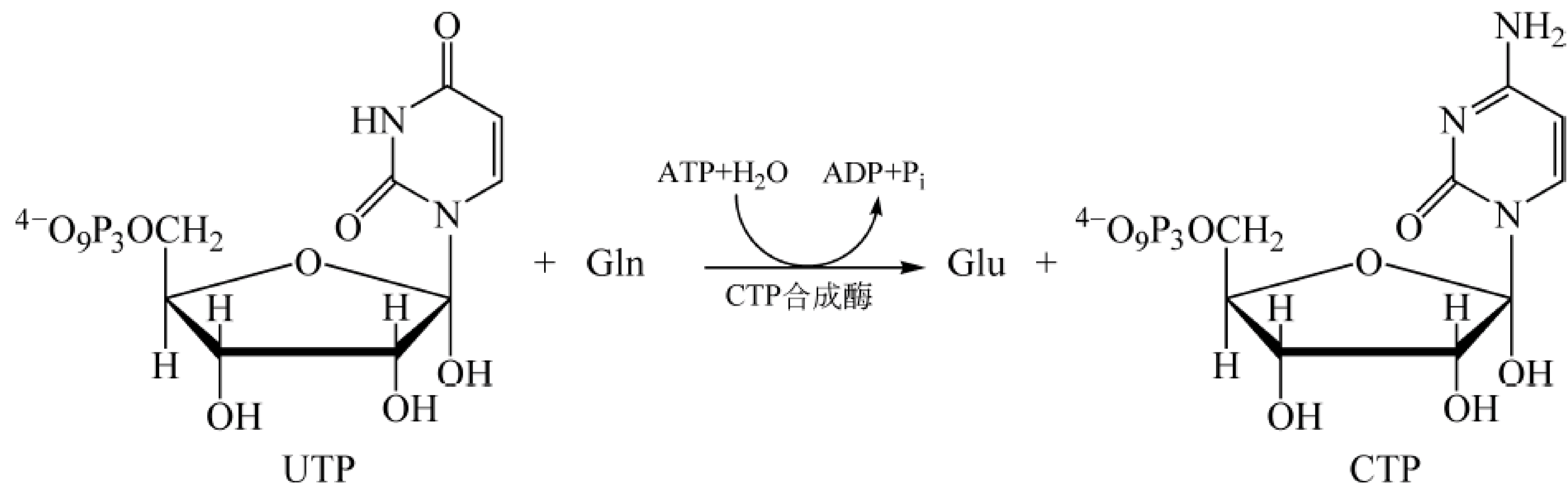


图20.10 UTP转换成CTP

在动物中,不是ATCase,而是CPSⅡ受到别构调控,UDP和UTP是CPSⅡ的反馈抑制剂,PRPP和ATP是CPSⅡ的别构激活剂。

20.3 脱氧核糖核苷酸的合成

脱氧核糖核苷酸主要是作为构件分子用于合成DNA。在大多数生物中,核糖核苷二磷酸(NDP)是用于合成脱氧核糖核苷酸的底物。在核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)催化下,NDP中核糖环上2′位被还原生成相应的2′脱氧形式的NDP(dNDP)(图20.11)。显然存在4种核糖核苷酸还原酶使得CDP、UDP、GDP和ADP还原为dCDP、dUDP、dGDP和dADP。

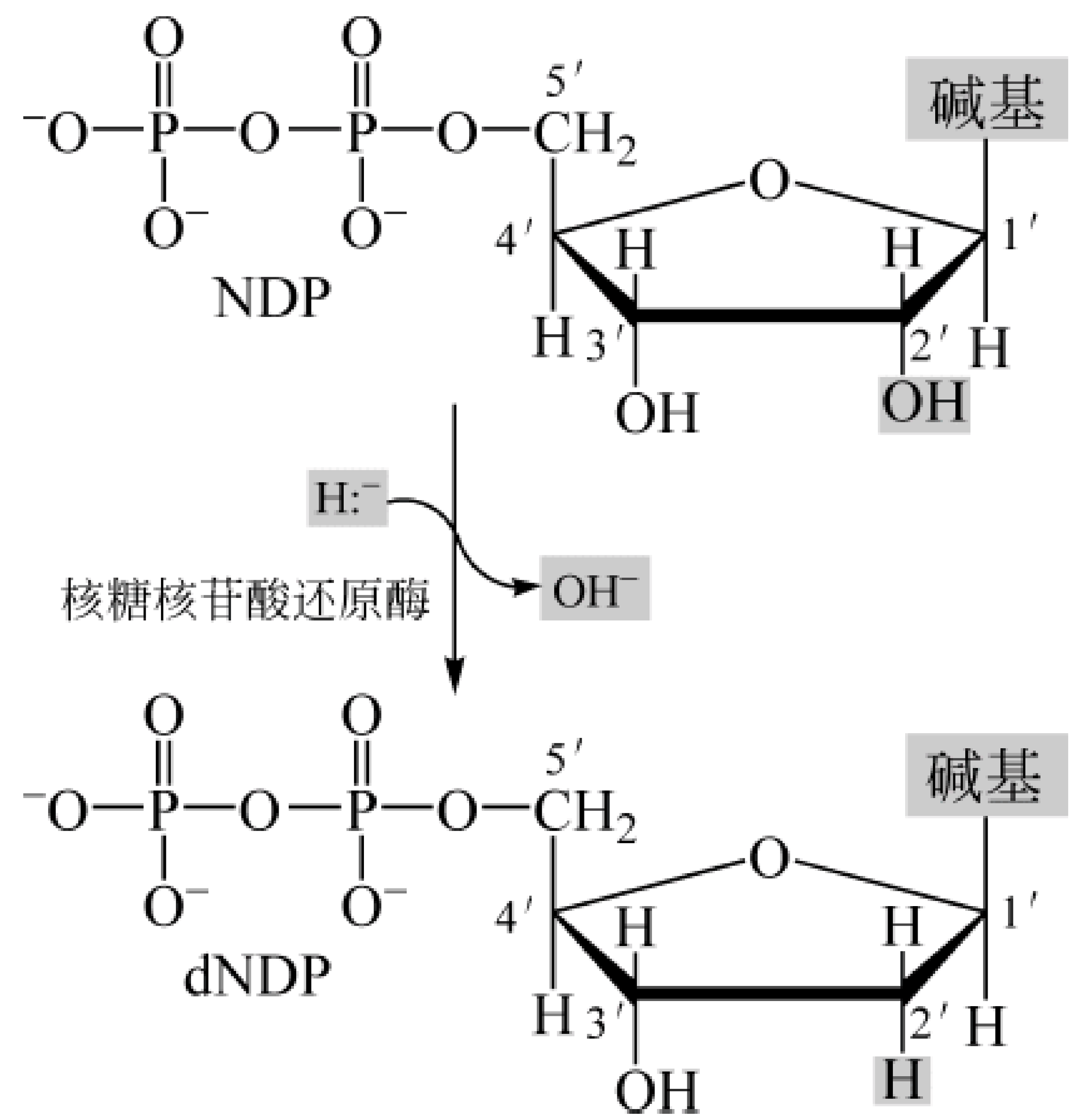


图20.11 脱氧核糖核苷二磷酸的合成

图20.11只是给出了由NDP合成dNDP的简单图示,实际上反应是由脱氧核糖核苷酸还原酶、硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶组成的酶系统催化的(图20.12)。

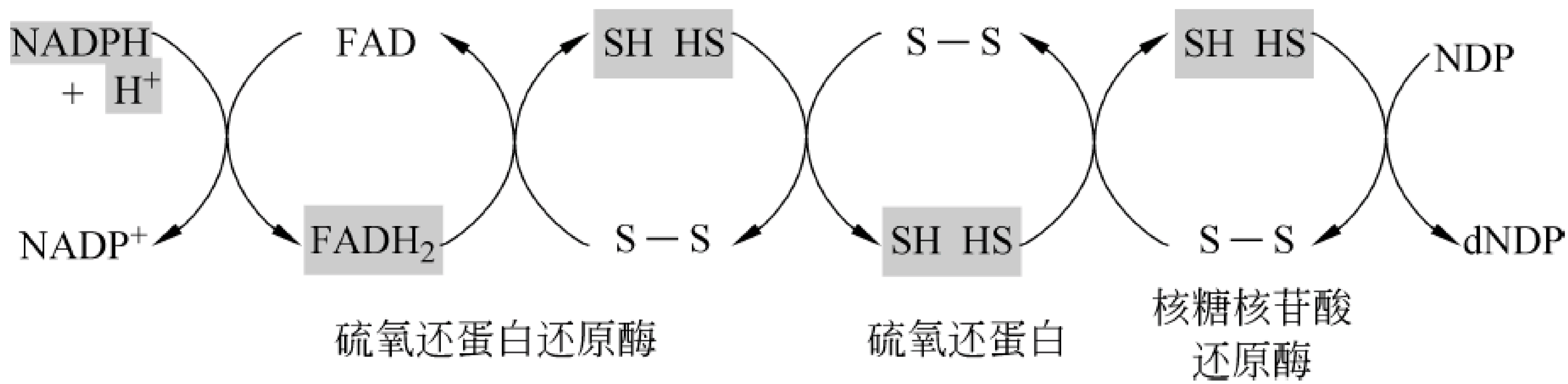


图20.12 氧化-还原循环

涉及硫氧还蛋白还原酶、硫氧还蛋白和核糖核苷酸还原酶

用于核糖核苷酸还原的最终的还原当量是NADPH。首先在依赖于NADPH的硫氧还蛋白还原酶(FAD作为辅酶)催化下,氧化型硫氧还蛋白(—S—S—)转换为还原型硫氧还蛋白(—SH HS—)。然后硫氧还蛋白再使氧化型核糖核苷酸还原酶(—S—S—)转换为有

活性的还原型核糖核苷酸还原酶(—SH　HS—)。核糖核苷酸还原酶通过一个复杂的自由基机制使得核糖核苷二磷酸还原为脱氧核糖核苷二磷酸。

像 NTP 生成那样,同样在核苷二磷酸激酶催化下,可以由 dNDP 磷酸化生成 dNTP。



DNA 合成需要的 dTMP 则是由 dUMP 甲基化形成的。首先 dUDP 转换为 dUMP,有两条途径:一条是在核苷单磷酸激酶催化下,dUDP 与 ADP 反应生成 dUMP 和 ATP;另一条途径是 dUDP 先形成 dUTP,然后水解生成 dUMP 和 PP_i。生成的 dUMP 在胸苷酸合酶(thymidylate synthase)催化下接收 5,10-亚甲基四氢叶酸提供的—CH_3 生成 dTMP。失去一碳单位的二氢叶酸经二氢叶酸还原酶还原变成四氢叶酸,再接收丝氨酸提供的一碳单位可以重新形成 5,10-亚甲基四氢叶酸(图 20.13)。

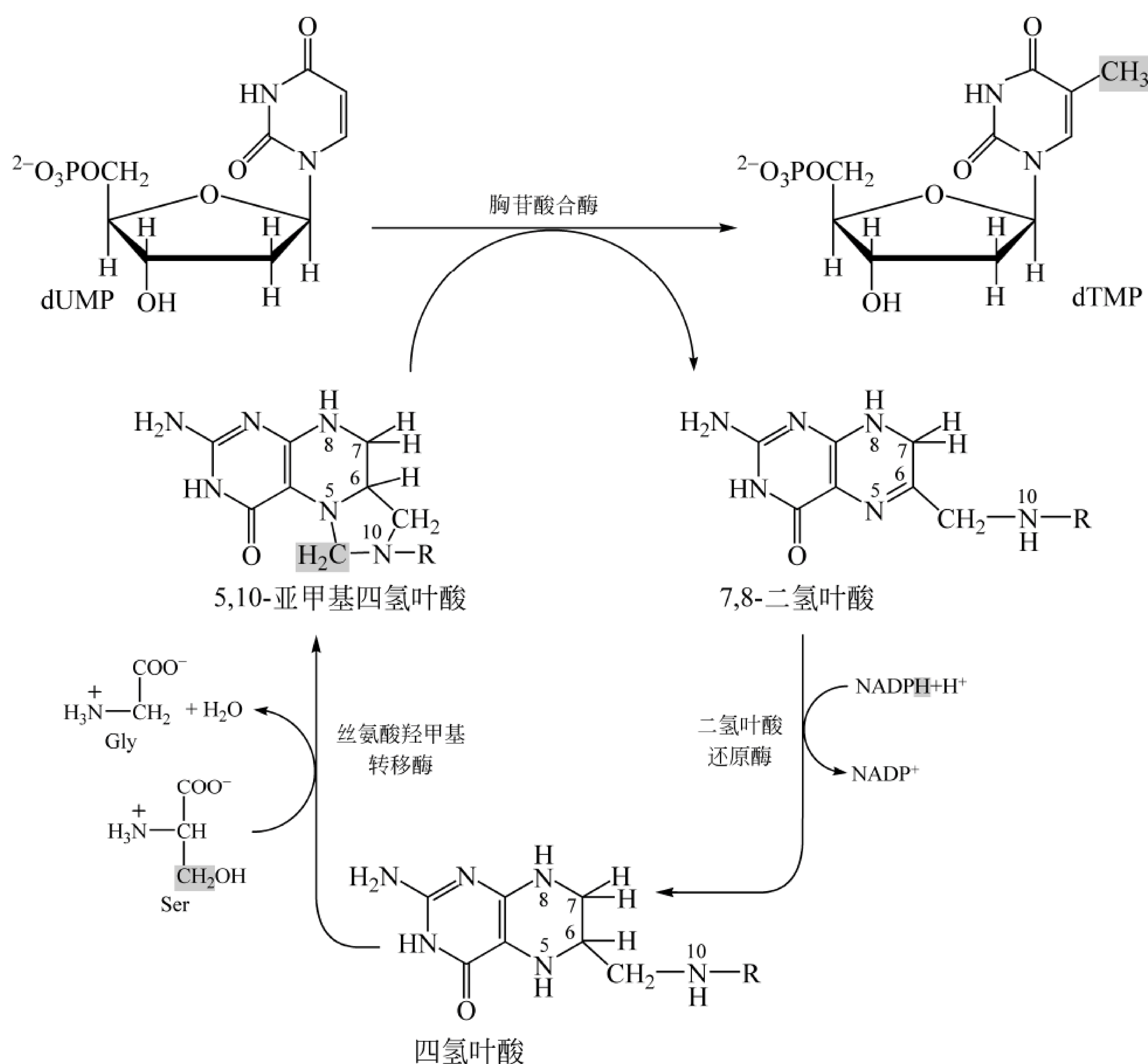


图 20.13　由 dUMP 合成 dTMP

20.4　嘌呤核苷酸的降解

尽管细胞内大多数的嘌呤可以通过补救途径合成相应的核苷酸,也就是说可以回收,但还是有些碱基被降解。这些碱基来自过量消化的核苷酸或来自细胞内正常的核酸降解。

20.4.1　AMP 和 GMP 的降解

图 20.14 给出了 AMP 和 GMP 降解至尿酸的途径。AMP 经 5′-核苷酸酶(5′-nucleotidase)水解除去磷酸形成腺苷,再经腺苷脱氨酶(adenosine deatninase,ADA)催化脱氨形成次黄嘌呤核苷。AMP 也可以在 AMP 脱氨酶(AMP deaminase)的作用下脱氨生成 IMP,IMP 水解生成次黄嘌呤核苷。次黄嘌呤核苷经磷酸解形成次黄嘌呤,然后在黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidasse)催化下被氧化为黄嘌呤,再经黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸(uric acid)。IMP 也可在 IMP 脱氢酶催化下生成黄嘌呤核苷酸(XMP)。

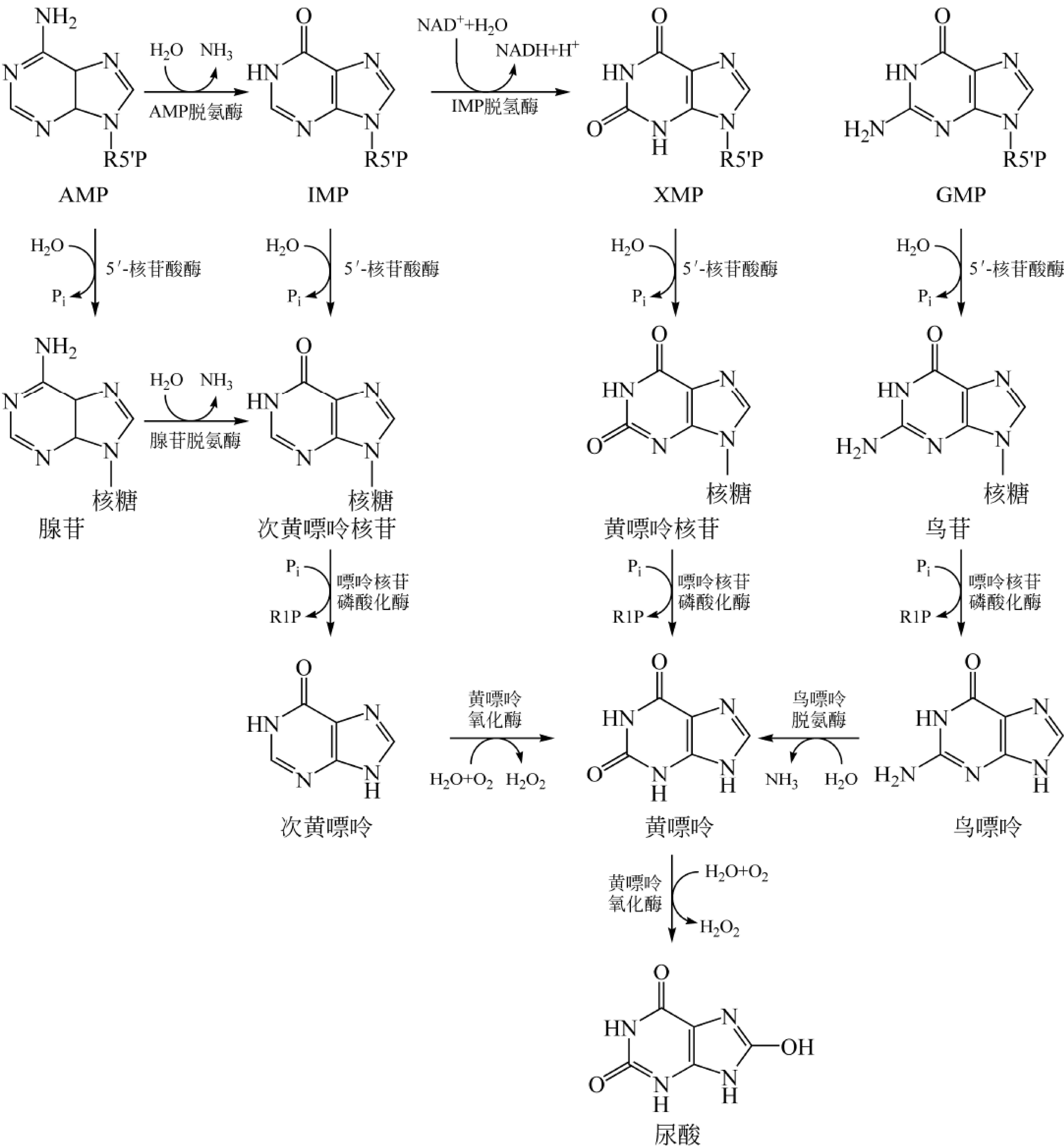


图 20.14　动物中嘌呤核苷酸降解至尿酸的主要途径

动物的嘌呤核苷酸和脱氧嘌呤核苷酸都被降解为尿酸。R1P：核糖-1-磷酸

GMP 经 5′-核苷酸酶催化生成鸟苷，然后鸟苷磷酸解生成鸟嘌呤。鸟嘌呤在鸟嘌呤脱氨酶(guanine deaminase)的催化下脱氨形成黄嘌呤，黄嘌呤氧化形成尿酸。

核苷磷酸解反应一般都是由嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase)催化的，生成核糖-1-磷酸(或脱氧核糖-1-磷酸)和碱基，但腺苷不是哺乳动物嘌呤核苷磷酸化酶的底物。

包括人在内的灵长类动物、鸟类和一些爬行动物，嘌呤降解的最终产物是可随尿排出的尿酸。不过鸟类和一些爬行动物不能排尿素，但这些生物可通过嘌呤合成途径将过量的氨基酸氮合成嘌呤，再降解至尿酸。尿酸只是微溶于水，排泄尿酸时只有少量水一同排出，粪便为尿酸晶体糊状物，所以这一排氮途径可保存水分。

很多动物还可以进一步降解尿酸(图 20.15)。尿酸经尿酸氧化酶等 3 个酶催化形成尿囊素(allantoin)，大多数哺乳动物(不包括人)、海龟和一些昆虫和软体动物可以将将尿酸降解至尿囊素。一些硬骨鱼可以将尿囊素转化为尿囊酸(allantoate)。大多数鱼类、两栖类动

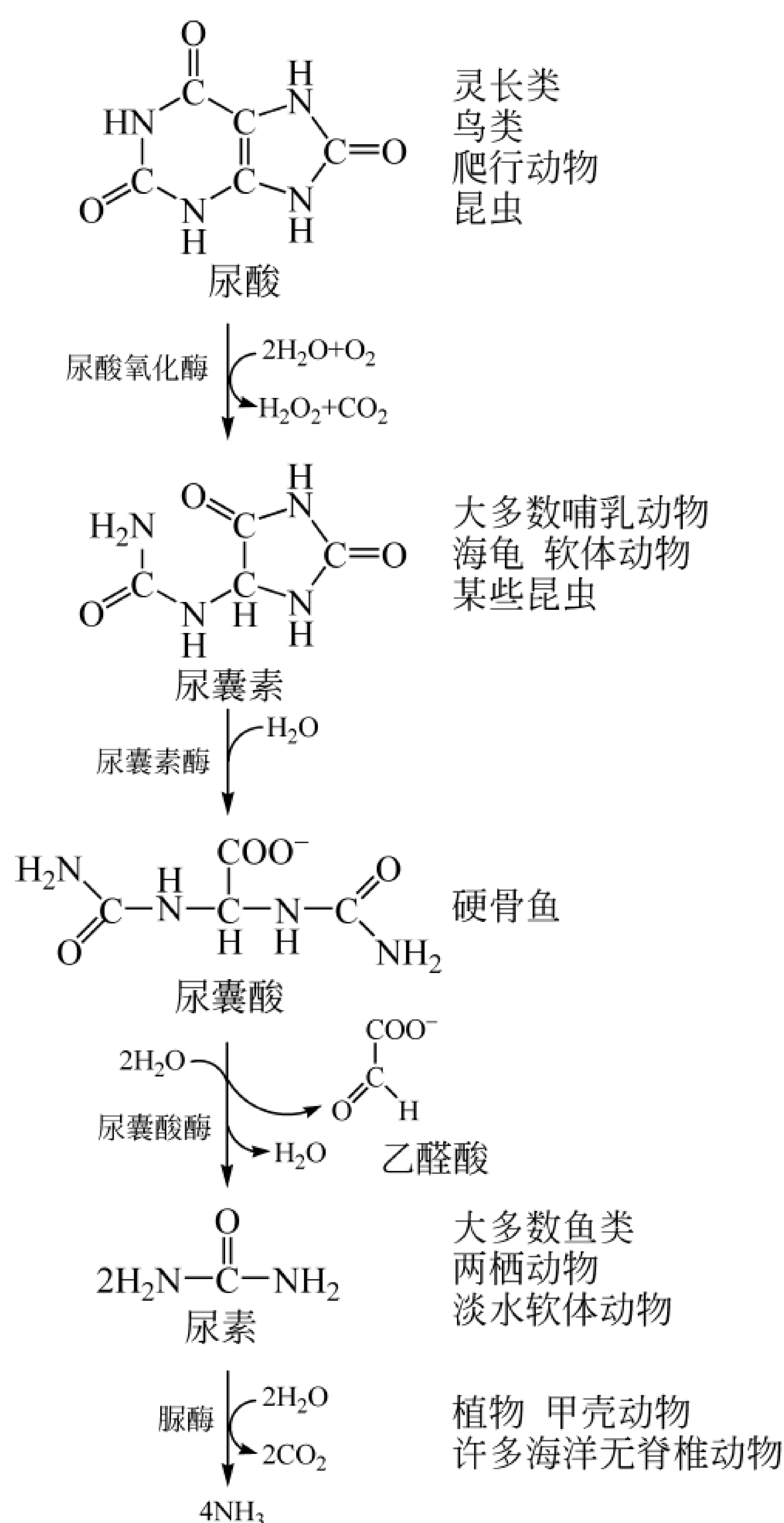


图 20.15 尿酸降解

不同动物可将尿酸降解成不同产物后排出体外

物及淡水软体动物可以进一步将尿囊酸降解至尿素和乙醛酸。植物、甲壳类动物和一些海洋无脊椎动物可以在脲酶催化下将尿素水解生成 CO_2 和 NH_3。

痛风(gout)是一种由于尿酸生产过量或尿酸排泄不充分造成堆积引起的疾病,常见的症状是突发的极为痛苦的关节炎(首发部位通常是脚的大踇趾)。起因都是由几乎不溶的尿酸钠晶体沉积在关节的滑液中造成的。尿酸钠和(或)尿酸也会以结石形式沉淀在肾和输尿管中,导致肾损伤和尿道堵塞。

据统计,每100个人中约有3人患痛风,主要为男性。痛风与过度放纵饮食有关,尤其是食用富含嘌呤的食物,例如肝、胰腺、鱼和葡萄酒等易于刺激易感个体急性痛风发作。另外,痛风也可能是代谢缺陷引起的,例如次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷(前面提到,严重时导致 Lesch-Nyhan 综合征)使 PRPP 水平升高,导致过多尿酸生成。

治疗痛风的常用药是一种黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇(allopurinol),它是 N-7 和 C-8 互换位置的次黄嘌呤类似物(图 20.16)。别嘌呤醇在黄嘌呤氧化酶催化下转换为别黄嘌呤(alloxathine),产物别黄嘌呤却与酶本身紧密结合,结果使酶失活,阻断了尿酸的合成。像别嘌呤醇这样的酶底物类似物经酶作用后却成了酶本身的灭活剂,称为自杀性抑制剂。

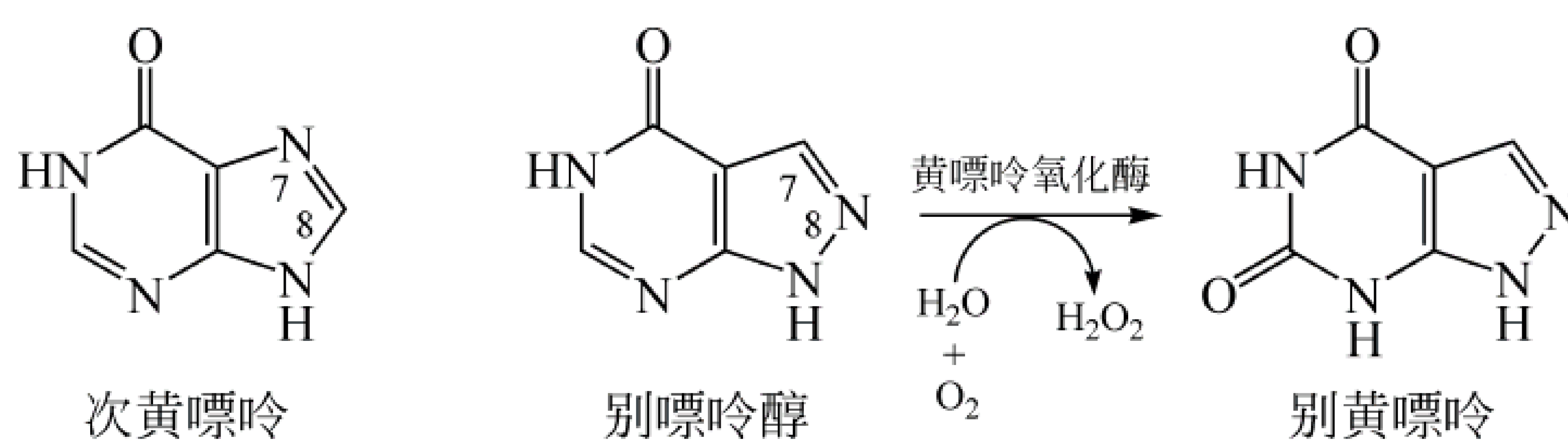


图 20.16 别嘌呤醇和别黄嘌呤

服用别嘌呤醇在增加了易溶的次黄嘌呤和黄嘌呤的水平的同时,降低了尿酸生成的速度,从而缓解了痛风的症状。

相关话题 ADA缺乏的基因治疗

重度联合免疫缺陷综合征(SCID)是对感染失去免疫反应的一组相关的遗传失调疾病。这种免疫缺陷是由于B淋巴细胞和T淋巴细胞没有能力增殖和产生针对抗原的抗体造成的。其中约30%的SCID患者是由于腺苷脱氨酶(ADA)缺乏导致的。

在缺少ADA时,脱氧腺苷不能降解,取而代之的是被磷酸化,依次转换为dAMP,dATP。结果产生了高于正常值50倍的dATP(图 20.17)。dATP是脱氧核苷酸合成的一个很强的反馈抑制剂,没有脱氧核苷酸,DNA不能复制,细胞也不能分裂。如果DNA合成被破坏,最容易受到影响的是快速增殖类型细胞,例如淋巴细胞。

为了提高ADA基因缺陷的SCID病人免疫系统,人们尝试注射正常ADA与聚乙二醇[$HO—(CH_2—CH_2O)_nH$)]的共价结合物,实验表明有一定程度的提高。然而,对ADA缺乏病人更有效的治疗方法是基因治疗(gene therapy)。ADA缺陷的基因治疗实验最早开始于1990年,是由 W. French Anderson 和 Michael Blaese 完成的。他们首先从ADA缺乏的患儿血中抽提淋巴细胞,在实验室培养。然后利用基因工程技术将正常的ADA基因引入

培养的淋巴细胞，最后再将该细胞返回到患儿体内。有 1 例能够产生 ADA 的细胞在患儿体内存活了数年。

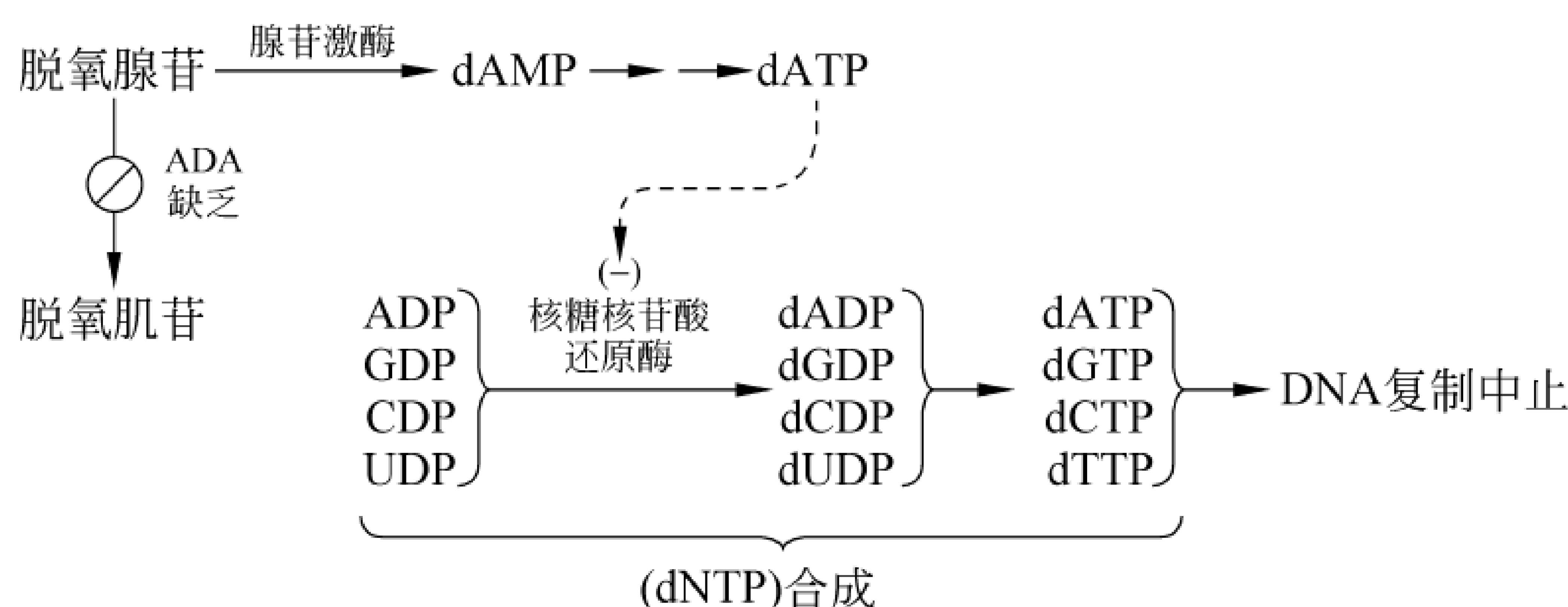


图 20.17　ADA 缺乏导致脱氧腺苷生成 dATP

如果 ADA 有缺陷或缺乏，脱氧腺苷就不能转换为脱氧肌苷。取而代之，经核苷激酶催化走补救途径，转换为 dAMP，导致 dATP 积累和脱氧核苷酸合成的抑制，DNA 复制停止

20.4.2　嘌呤核苷酸循环

图 20.14 给出了动物中嘌呤核苷酸和脱氧嘌呤核苷酸分解代谢的主要途径。但是腺苷和脱氧腺苷不能像鸟苷那样直接被哺乳动物的嘌呤核苷酸磷酸化酶降解，而是要经 AMP 脱氨酶和腺苷脱氨酶脱去氨基，生成相应的 IMP 或次黄嘌呤核苷后再被进一步降解。

当 AMP 脱氨生成 IMP 与由 IMP 合成 AMP 偶联就构成了存在于骨骼肌中的嘌呤核苷酸循环(purine nucleotide cycle)(图 20.18)。

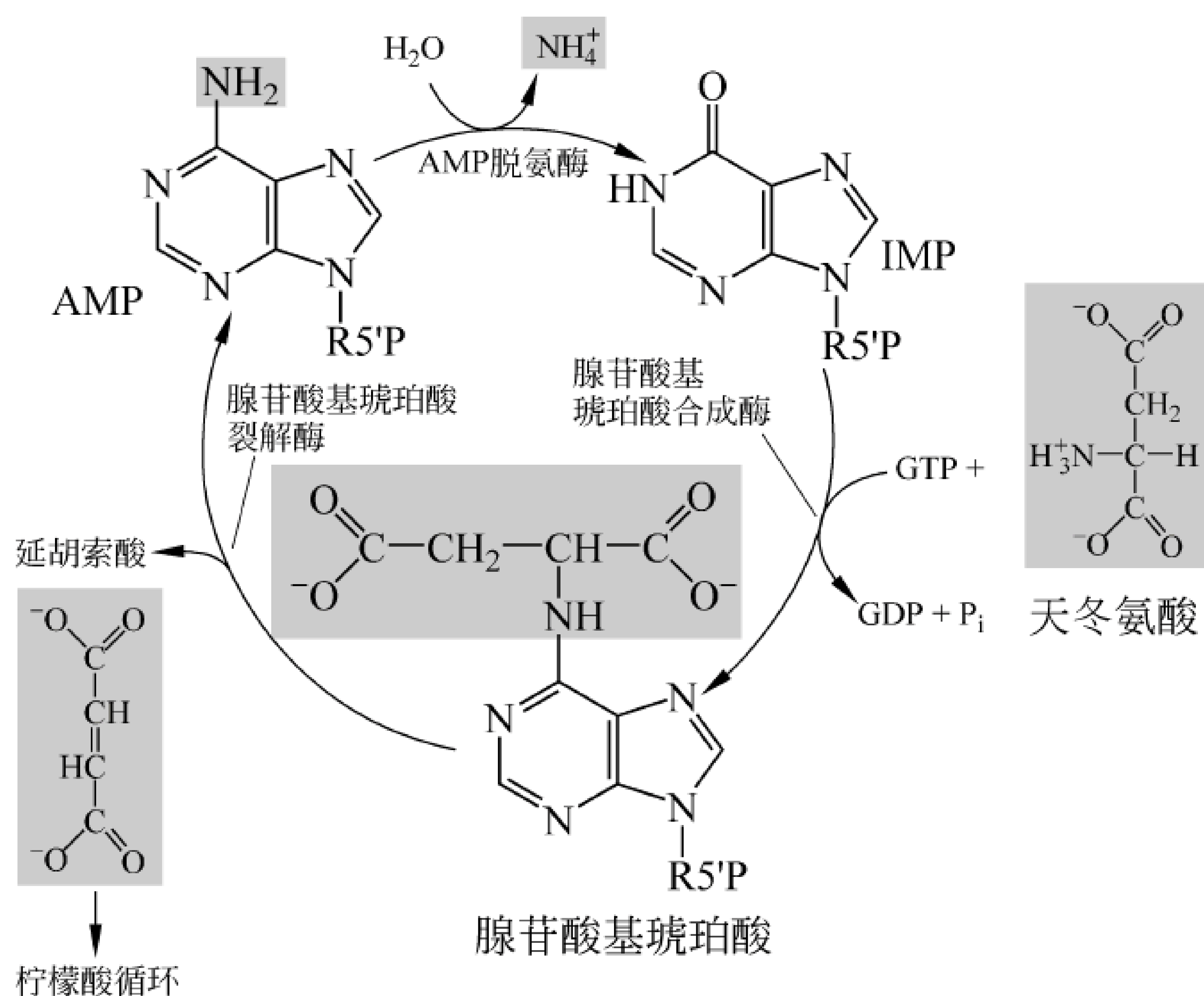


图 20.18　嘌呤核苷酸循环

R5′P 代表核糖-5′-磷酸

嘌呤核苷酸循环的净反应就是将天冬氨酸转化为延胡索酸和 NH_4^+。生成的延胡索酸添补到柠檬酸循环,增加循环中间物,因此增强了氧化乙酰 CoA 的能力,为肌肉活动提供更多的能量。肌肉组织中缺乏其他组织催化添补反应的大部分酶,但嘌呤核苷酸循环涉及的三种酶的活性比其他组织高好几倍,所以该循环在骨骼肌的能量代谢中起着非常重要的作用。AMP 脱氨酶遗传性缺陷的个体肌肉很容易疲劳,而且在运动后经常会出现痉挛现象。

20.5 嘧啶核苷酸的降解

图 20.19 给出了 3 种嘧啶核苷酸降解至尿嘧啶和胸腺嘧啶的过程。嘧啶核苷酸的降解是从水解生成相应的核苷和 P_i 开始的,反应由 5′-核苷酸酶催化。然后胞苷经胞苷脱氨酶催化脱氨形成尿苷。尿苷经尿苷磷酸化酶(uridine phosphorylase)催化生成尿嘧啶和核糖-1-磷酸。而胸苷经胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase)催化生成胸腺嘧啶和脱氧核糖-1-磷酸。

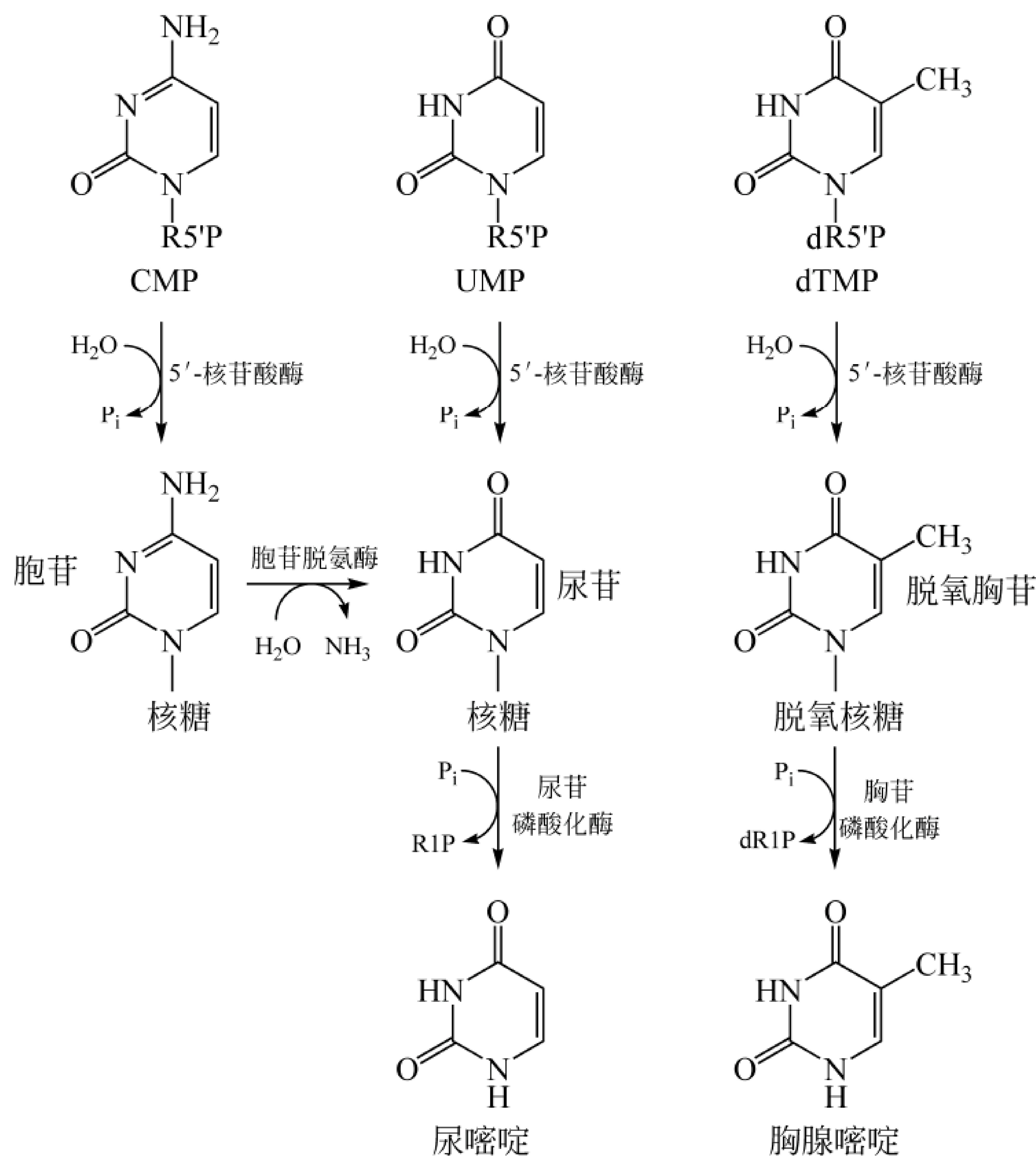


图 20.19 3 种嘧啶核苷酸降解至尿嘧啶或胸腺嘧啶

R1P:核糖-1-磷酸;dR1P:脱氧核糖-1-磷酸

胞嘧啶和胸腺嘧啶可以继续降解生成乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA(图 20.20)。尿嘧啶首先还原为 5,6-二氢尿嘧啶,然后在二氢嘧啶酶的催化下生成脲基丙酸(ureidopropionate),脲基丙酸进一步水解生成 NH_4^+、HCO_3^- 和 β-丙氨酸。胸腺嘧啶降解途径类似于尿嘧啶,经

酶催化首先生成二氢胸腺嘧啶，然后生成脲基异丁酸（ureidoisobutyrate），再由脲基异丁酸生成β-氨基异丁酸。

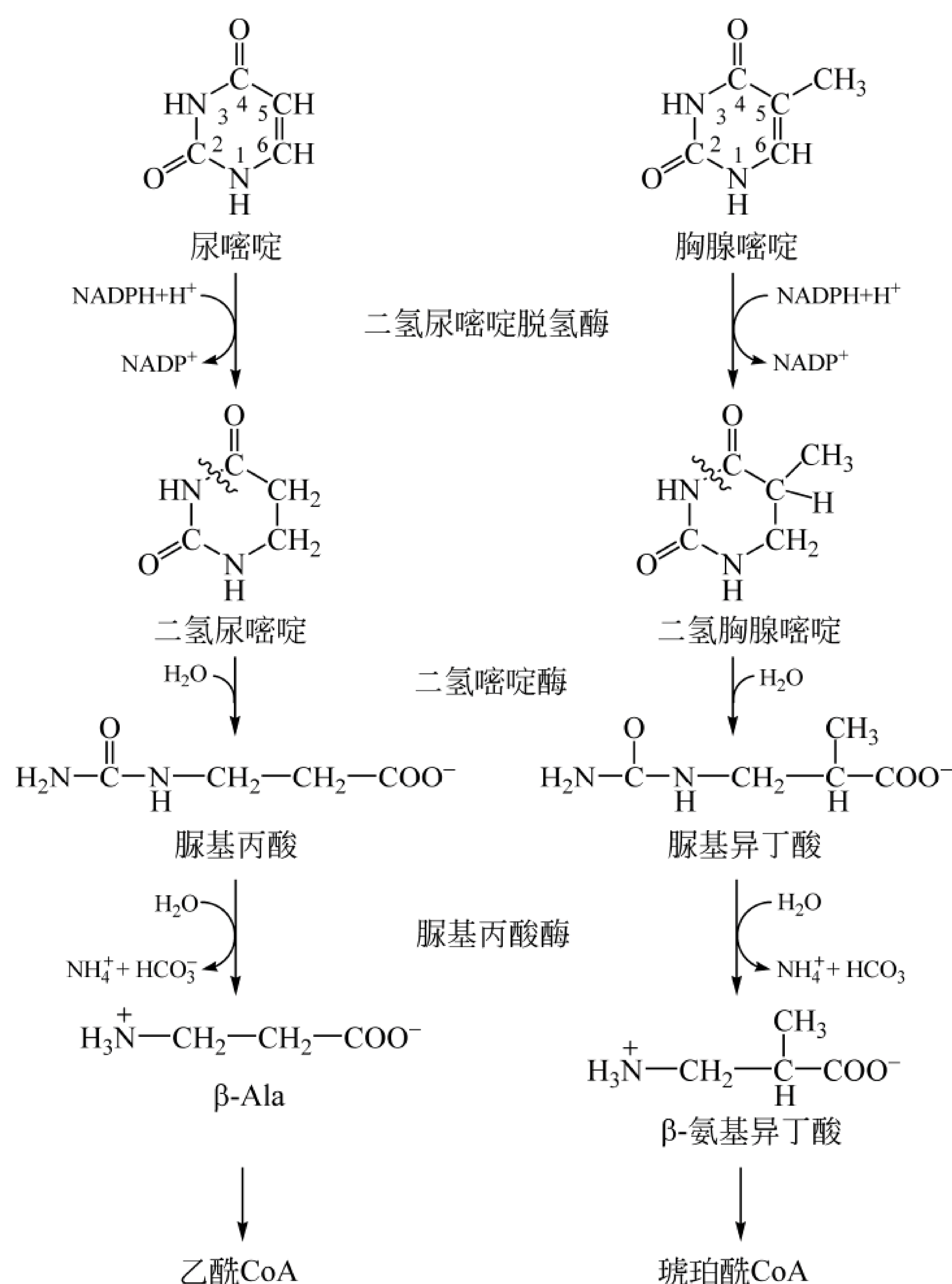


图 20.20　尿嘧啶和胸腺嘧啶降解至乙酰 CoA 或琥珀酰 CoA

β-丙氨酸可以转换为乙酰 CoA，β-氨基异丁酸可以转换成琥珀酰 CoA，它们都可以进入柠檬酸循环进一步代谢。

小结

1. IMP 从头合成是在核糖-5-磷酸基础上逐步合成嘌呤碱基的 10 步反应过程。IMP 由天冬氨酸提供氨基可以生成 AMP；IMP 由谷氨酰胺提供氨基可以生成 GMP。

2. 在嘧啶核苷酸（UMP）的 6 步合成途径中，首先完成嘧啶环的合成，然后连接核糖-5-磷酸（PRPP）。UMP 通过磷酸化可转换为 UTP，UTP 通过氨基化可转换为 CTP。

3. 在核糖核苷酸还原酶催化的反应中核糖核苷酸 2′处还原可生成脱氧核糖核苷酸。

4. 通过甲基化反应，可以由 dUMP 合成 dTMP，在该反应中 5，10-亚甲基四氢叶酸贡

献出一碳基团和一个氢负离子。甲基化的另一个产物 7,8-二氢叶酸通过依赖于 NADPH 的还原作用再循环为活性辅酶四氢叶酸。

5. 在补救途径中 PRPP 与嘧啶和嘌呤反应生成核苷单磷酸。核苷酸和它们的成员在不同酶的作用下可以相互转换。

6. 在鸟类和一些脊椎动物中来自氨基酸和嘌呤核苷酸的氮可以以尿酸形式排泄。灵长类动物可以将嘌呤降解为尿酸,大多数其他生物可进一步将尿酸降解为尿囊素、尿囊酸、尿素或氨。

7. 肌肉组织中存在的嘌呤核苷酸循环净反应是将天冬氨酸转化为延胡索酸和 NH_4^+,生成的延胡索酸添补到柠檬酸循环中增强了氧化乙酰 CoA 的能力,为肌肉活动提供更多能量。

8. 嘧啶可被降解为氨、碳酸氢盐和乙酰 CoA(来自胞嘧啶或尿嘧啶)或琥珀酰 CoA(来自胸腺嘧啶)。

习题

1. PRPP 合成酶使用 α-*D*-核糖-5-磷酸作为底物。细胞内 α-异构体是怎样形成的?

2. 当利用下列物质作为前体时,核素标记出现在 IMP 的什么位置?

(a) 酰胺用 ^{15}N 标记的谷氨酰胺。

(b) 2-[^{14}C]-甘氨酸。

3. 从 5-磷酸核糖开始合成一分子 IMP 需要多少 ATP 当量?假设途径中所有其他前体均存在。

4. 在真核细胞中,由 HCO_3^-、天冬氨酸、谷氨酰胺和核糖-5-磷酸合成一分子 UMP 需要多少 ATP 当量?忽略在该途径中由于 QH_2 的氧化可能产生的任何 ATP。

5. 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)催化下面两个反应:





严重的 HGPRT 遗传缺陷引起 Lesch-Nyhan 综合征,患者智力迟钝,富于攻击性,并有强制性的自残行为。这样的代谢变化是如何发生的呢?

6. 从细菌中分离出的核糖核苷酸还原酶液要在冰箱中储存一段时间。是否可向酶液中加入一些还原型谷胱甘肽以提高酶的稳定性并减少储存过程中的酶活性的降低?加一些碘乙酰胺可以吗?

7. 临床上用氟尿嘧啶作为化疗药物是基于什么生化原理?为什么使用氟尿嘧啶进行化疗时患者头发会暂时脱落?

8. 正常的细胞会死于含有胸苷和甲氨蝶呤的培养基中,而缺失胸苷酸合酶的突变细胞能够存活并生长。请解释。

9. 痛风的一个起因是缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶活性,另一个起因是 PRPP 合成酶活性的增加。如果人体中 PRPP 是谷氨酰胺-PRPP 酰胺转移酶的正调节剂,那么它是怎样影响嘌呤合成的?

10. 脂肪和糖的分解代谢提供了以 ATP 形式出现的大量能量。在真核细胞中嘌呤和嘧啶的降解是否能成为一个重要的能源?

习题解答

2 氨基酸和蛋白质一级结构

1. 不正确，因为没有一个 pH 能够使氨基酸的氨基和羧基同时处于 NH_2 和 COOH 形式。应当将氨基改成带正电荷的—$\overset{+}{N}H_3$，将羧基改成带负电荷的—COO^-。

2. (a)曲线中 2、4、6 位置；(b)1、4、5、7；(c)5 ；(d)5；(e)$pK \pm 1$ 的 pH 范围：0.82～2.82；5～7；8.17～10.17。

3. 图 c。可将图逆时针旋转 90°，使 pH 轴朝上，然后判断。旋转后图 c 和图 d 都有些像 Lys 的滴定曲线，考虑到 Lys 侧链基团解离 pK 值接近 9，所以图 c 符合题意。

4. 根据残基侧链在 pH6 下的解离情况判断。

a：Asp—Phe；　b：Gly—Cys；　c：Tyr—Lys

5. 在 A8 点，鸭胰岛素是 Glu，而人是 Thr。因为在生理 pH 下 Glu 是带负电荷，Thr 为中性，所以人胰岛素 pI 比鸭的高(其他氨基酸不会影响 pI，因为它们都不带电)。

6. 根据公式 $A=\varepsilon c$，先算出 c。

$$0.6 = 15.0\text{cm/mol} \times c \times 1\text{cm}$$
$$c = 0.04\text{mol/L}$$

最小相对分子质量 MW　0.005×0.04＝10/MW，MW＝50 000

7. SDS-PAGE 的整个 1 块胶相当于 1 个筛子，显然小的跑得快，大的阻力大迁移慢，落在后面。而在凝胶层析中，1 个凝胶球相当于 1 个“筛子”，大分子进不去，则在凝胶颗粒外部流过，流过的距离较短，先出来；而小分子可以进入凝胶球中，结果走的路程长，所以落在大分子后面。

8. 谷氨酸首先被洗脱，因为 pH 接近其 pI。亮氨酸和赖氨酸会带正电与柱结合，洗脱亮氨酸需要将 pH 提高到 6 左右，洗脱赖氨酸需要将 pH 提高到 11。

9. 这 2 个肽链化学上有区别。开链存在游离的 N 端与 C 端，在适当的 pH 条件下都可以带电，而闭环两端连接形成肽键。利用这个区别可以通过电泳将这 2 个肽分开。

10. 这个新蛋白似乎是由 4 个 60 000 的亚基组成的四聚体蛋白。每个亚基又是一个由 2 个肽通过至少 1 个二硫键连接构成的二聚体，一个为 34 000，另一个为 26 000。

3 蛋白质的三维结构

1. (a) Gly 存在于 α-螺旋中使得螺旋不稳定，由于侧链小使得它的移动自由度更大。由于这一原因，所以许多 α-螺旋开始或末尾带有 Gly。

(b) pro 由于它的刚性有破坏 α-螺旋的倾向，从立体化学上看环形侧链将干扰通常由

α-螺旋中相邻残基占据的空间。另外,Pro 缺少酰胺氮上的氢,不能参与正常链内氢键形成。

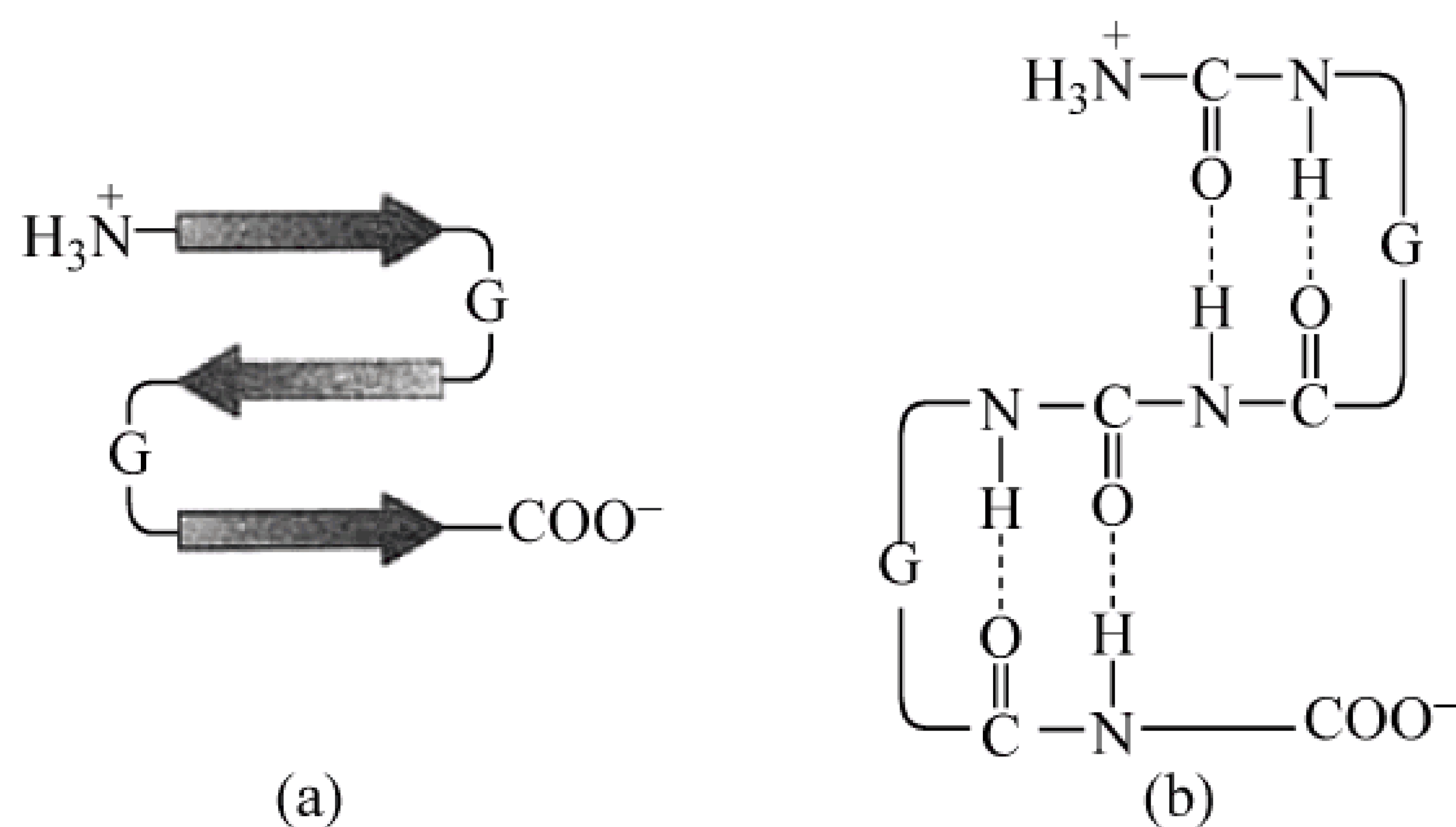
2. (a) 在 α-螺旋中,链内氢键是在某一残基的羰基氧和另一个残基的酰胺氢之间形成的,氢键与螺旋轴近似平行。

(b) 在胶原 3 股螺旋中存在链间氢键,不存在链内氢键。链间氢键是由 1 条链中 Gly 的酰胺氢与相邻链中(常常是 Pro)残基的羰基氧之间形成的。

3. Met、Leu、Phe 和 Ile 的高疏水性侧链最有可能处于螺旋的侧面(朝向蛋白质内部)。其他大多数侧链是极性或带电荷的,可与水相溶剂相互作用。由于 α 螺旋是一个每圈近似有 3.6 残基的重复结构,沿着序列每隔 3 个或 4 个残基应当出现疏水基团,以使螺旋的一侧是疏水的。

4. (a) 由于小侧链(—H)使得它有更大的自由度,Gly 常出现在连接连续反平行 β 链的"发卡环"转弯处。位置 8 和 14 中的 Gly 残基(G)提供 2 个发卡环区域来连接该多肽中的 3 个 β 链。

(b) β 折叠结构是通过一条链中的羰基氧和相邻链上的酰胺氢之间形成的氢键稳定的。



(a) (b)

5. 通过烫发使头发成形部分是由于头发中主要蛋白—角蛋白中的正常二硫键经烫发操作造成二硫健错接造成的。例如通过向头发上涂巯基试剂和湿热条件下使头发中的二硫键打开,然后将头发卷成卷,再涂上氧化剂使游离的巯基形成错接的二硫键,从而使所希望的发型稳定。

6. 每打开 1 个二硫键需 2 摩尔的巯基乙醇,故每个蛋白质分子中一定含有 3 个二硫键。因此,该蛋白由 3 个完全相同的肽链(MW=20 000)组成,3 个肽链可能通过互相形成 1 个或 2 个二硫键连成线形结构,也可能通过首尾相连形成环状结构。

7. 序列—Gly—Pro—X—Y—经常出现在身体各处包括皮肤在内的胶原中,由于幼虫分泌的酶能催化胶原链的裂解,使得寄生虫可进入宿主。

8. 羟脯氨酸不属于由 mRNA 合成蛋白质使用的 20 种标准氨基酸。胶原中特殊的脯氨酸残基只在肽链合成后经脯氨酰羟化酶氧化才形成 4-羟脯氨酸。因此,只有注射 ^{14}C 标记的脯氨酸才能生成放射性标记的胶原纤维。

9. 对于每个单体来说几率为 $1/5\times1/3\times1/1=1/15=0.067$ 或 6.7%。能够形成天然二聚体的几率是 $0.067\times0.067=0.0044$ 或 0.44%。

10. CO 与血红蛋白结合的亲和力比 O_2 与之结合的亲和力高得多,因此 CO 不能被高

浓度的氧气置换。在实践中,CO 与血红蛋白的结合是不可逆的(至少在短期内)。因此,需要输送新鲜的血液才能抵消毒性。

11. 当鳄鱼不呼吸待在水下时,血液里代谢产生 CO_2,因此它血液中的 HCO_3^- 含量增加。HCO_3^- 优先与脱氧血红蛋白结合,别构效应促进血红蛋白迅速转向脱氧构象,并释放氧气。这有助于鳄鱼可在水下较长时间捕食。

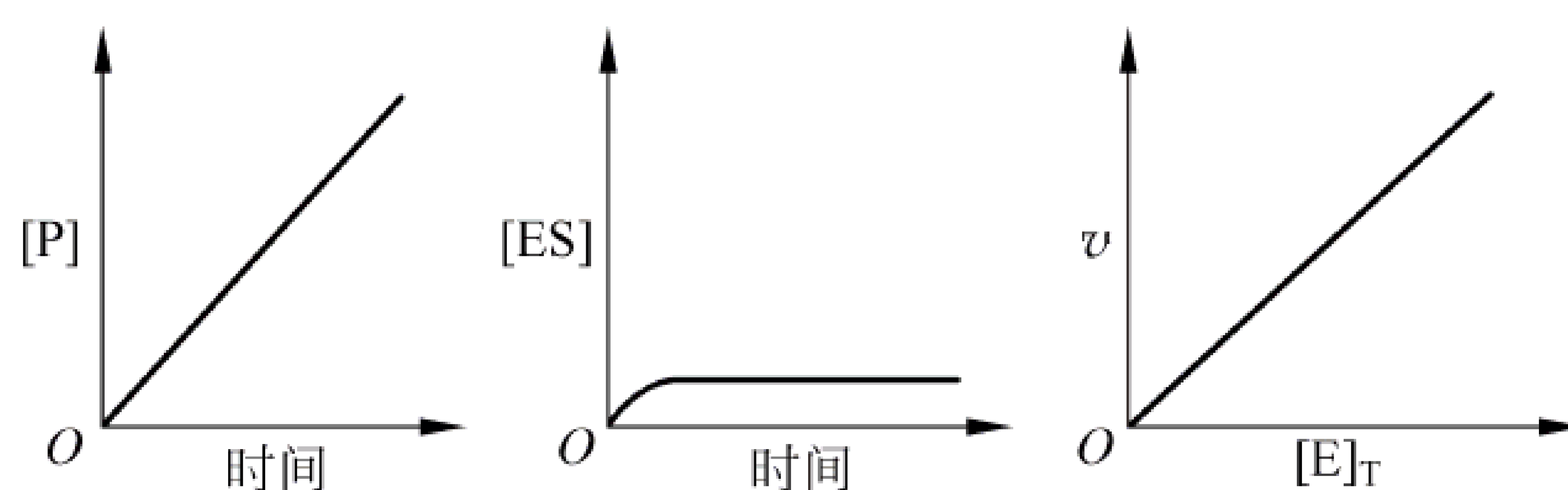
12. HbS 是 HbA 的 β-链的第 6 位 Glu 突变为 Val 的产物,相当于增加了 1 个疏水黏斑,当脱氧之后,HbS 之间就是靠这个疏水黏斑结合形成细长纤维的,由于 HbA 可以与上 1 个 HbS 结合,但不能与下一个 HbS 结合,就是说 HbA 缺少黏斑,所以可中断纤维的生长。

4 酶

1. Asp101 和 Arg114 与底物分子可形成氢键。Ala 不能与底物分子形成这些氢键,所以替换后的酶的活性很低。

2. 当 pH 接近 pK_R 时,His 残基逐渐去质子化,作为酸催化剂的能力逐渐减弱。当 $pH=pK_R$ 时,50%的 His 残基处于去质子化状态,酶也处于半活化状态。当 pH 大大超过 pK_R 时,几乎所有的 His 残基去质子化,酶失活。

3.



4. 在底物浓度高时初速度接近一个恒定值,所以可以认为 $v_{max}=70$mmol/min。由于 K_m 等于达到最大速度一半(35mmol/min)时的底物浓度,所以 $K_m=0.01$mmol。

5. 由于 $v_{max}=k_2E_T$,如果 E_T(酶总浓度)增加,v_{max}将增加。$K_m=(k_{-1}+k_2)/k_1$,即 K_m 与底物浓度无关。所以图(b)是题目条件所描述的曲线。

6. 产物 P 会更多些,因为酶 A 比酶 B 有较低的 K_m。由于酶 A 与酶 B 的 v_{max}大致一样,酶的相对效率主要取决于它们的 K_m。

7. (a)反应遵循乒乓机制,会出现 A^*,因为只有双置换反应才可能在缺少 B 的情况下使核素由 P 交换回到 A。A=P-X,表示 X 为底物 A 的功能基团,当与酶反应时,生成产物 P 和 E—X。(b)在遵循有序机制的反应中,A 将不会变成核素标记的。

8. 当[S]=100μmol 时,$[S]\gg K_m$,因此 $v_0=v_{max}=0.1\mu$mol/min。

(a) 对于浓度大于 100μmol 的任一个底物,$v_0=v_{max}=0.1\mu$mol/min;

(b) 当$[S]=K_m$,$v_0=v_{max}/2$,或 0.05μmol;

(c) 由于 K_m 和 v_{max}已知,可以运用米氏方程计算任一底物浓度下的 v_0。

对于[S]=2μmol

$$\begin{aligned} v_0 &= v_{max}[S]/(K_m+[S]) \\ &= (0.1\mu mol/min)(2\mu mol)/(1\mu mol+2\mu mol) \\ &= (0.2/3)\mu mol/min = 0.067\mu mol/min \end{aligned}$$

9. pH 5.13,因为如果要使组氨酸侧链的咪唑基质子化,即带正电荷,酶所处的 pH 环境必须小于其 pK_R,但同时又要保证谷氨酸残基侧链 γ-羧基解离,带负电荷,所以最合适的 pH 就是两个基团 pK 的平均值,即 5.13。

10. (a) 确定酶总浓度,然后计算 v_{max}。

$$[E]_{总} = 0.2g/L(1mol/21500g) = 9.3 \times 10^{-6}mol$$

$$v_{max} = k_{cat}[E]_{总} = 1000/s(9.3 \times 10^{-6}mol) = 9.3 \times 10^{-3}mol/s$$

(b) 抑制剂存在下,v_{max}不变,属于竞争性抑制作用类型。因为抑制剂非常类似于七肽底物,通过结合酶的活性部位抑制酶活性。

11. 酶原是在一个器官里产生,然后到另一器官里起作用的消化酶的前体。如果这种酶一产生就具有活性,它会消化其他有用的细胞蛋白,造成伤害,如急性胰腺炎等疾病。通过酶原形式产生,酶可以安全运输到它发挥作用的消化器官如胃、小肠等。

12. 由于热变性使催化糖转化为淀粉的酶的活性丧失。

5 辅酶与维生素

1. (a)NAD^+、$NADP^+$、FAD、FMN 和细胞色素;(b)辅酶 A 和硫辛酰胺;(c)四氢叶酸、甲钴胺素和 S-腺苷蛋氨酸;(d)磷酸吡哆醛;(e)生物素、硫胺素焦磷酸和维生素 K。

2. 色氨酸是烟酸(尼克酸)合成的前体,而玉米中色氨酸含量很低,所以烟酸缺乏导致癞皮病流行。牛奶和肉类中色氨酸含量丰富。

3. 不能。NAD^+需要 2 个电子,但只需要 1 个质子,形成 NADH,第 2 个 H^+ 被释放到溶液中,被其他需要质子的反应再利用。

4. 由于辅酶 NAD^+ 与乳酸脱氢酶结合松散,经透析可以除去,所以透析使辅酶游离到透析袋以外,酶中 NAD^+ 很少,结果导致酶活性下降或失活。可以向失活的酶中添加 NAD^+,有可能恢复活性。

5. 因为这种只含有精白米的饲料中缺乏维生素 B_1(硫胺素),结果鸽子患上类似于人脚气病的多发性神经炎。由于米糠中含有硫胺素,所以鸽子很快就会恢复常态。

6. 维生素 B_6 可转换为吡哆醛磷酸,吡哆醛磷酸除了参与转氨反应之外,还参与分别由色氨酸和酪氨酸生成 5-羟色胺和去甲肾上腺素的脱羧反应。维生素 B_6 缺乏导致吡哆醛磷酸水平降低,势必减少神经递质的合成。

7. 脱氧胸苷酸(dTMP)的合成需要四氢叶酸(来自叶酸)衍生物。叶酸缺乏使得用于 DNA 合成的 dTMP 量减少,在红细胞前体中 DNA 合成减少导致细胞分裂慢,生成巨红细胞。由于破裂,细胞数量减少引起贫血。

8. (a)维生素 D_3;因为 D_3 经肾小管上皮细胞线粒体内 D_3 羟化酶催化可生成具有高生物活性的 1,25-二羟胆钙化醇,它调节人体内 Ca^{2+} 的利用;(b)受损的肾脏妨碍维生素 D_3 完全羟化形成 1,25-二羟胆钙化醇。

9. 两种来源的同一维生素分子结构是相同的,区别仅仅是含的杂质有所不同。身体无法区别不同来源的同一种维生素。

10. 在水相中会发现维生素 B_6 和维生素 C,在有机相中会发现脂溶性的维生素 A 和维生素 D。

6 糖

1. 吡喃葡糖有 5 个手性碳，因此可能有 2^5 或 32 个立体异构体，其中 16 个是 D 型糖，16 个 L 型糖。果糖有 4 个手性碳，因此可能有 2^4 或 16 个立体异构体，其中 8 个为 D 型，8 个为 L 型糖。

2. 葡萄糖的 α 异构体溶解度比 β 异构体差，因此更容易从溶液中析出来。结晶时，随着 α-葡萄糖的析出，溶液中的 β-葡萄糖要转换为 α-葡萄糖，以维持 36%α 对 63%β 的平衡比例。因此，α 异构体才能不断产生，并以晶体形式沉淀出来。

3. 葡萄糖的 α 异头物和 β 异头物处于快速平衡中，当 β-*D*-葡萄糖经葡糖氧化酶反应消耗时，会有更多的 α 异头物转换为 β 异头物，直至所有的葡萄糖都转换为 *D*-葡糖酸内酯。

4. 加热会使最甜的 β-*D*-吡喃型果糖转化为甜度差，但却最稳定的 β-*D*-呋喃型果糖。不只是高温下放置，即使是常温下放置时间过长，由于 β-*D*-呋喃型果糖比例增大，蜂蜜的甜度也会逐渐减弱。

5. 因为葡萄糖是个还原糖，有可反应醛基，富有反应性。而蔗糖是非还原糖，不存在可反应醛基。

6. 乳糖不耐受症指的是有些人在喝奶或食用奶制品时，不能分解和吸收奶中的乳糖，而导致腹痛、腹胀、腹泻和产气增多等症状。主要原因是这些人的小肠黏膜缺乏分解乳糖的乳糖酶。

不能喝鲜奶的人可选择喝酸奶，因为酸奶中乳酸杆菌、嗜热链球菌含有的乳糖酶可以分解奶中的乳糖。

7. 据实验观察，若要显现直链淀粉-碘复合物的特征蓝色，直链淀粉的长度最少要 6 个螺旋长，一个螺旋需要 6 个葡萄糖残基，共需要 36 个葡萄糖残基，所以所需的直链淀粉的最小相对分子质量应当为 $180\times36=6480$。

8. (a)每个糖原分子只有一个还原末端，而非还原末端就是糖原的分支数或 α-1,6-糖苷键数；(b)由于糖原分子中的非还原末端数远远超过还原末端数，糖原的降解和合成都发生在非还原末端，可使糖原降解和合成以最大速度进行。

9. 一般来说高纤维饮食脂肪含量较低，尤其是饱和脂肪低；纤维可以吸附胆固醇及很多可能有毒的物质，防止它们被身体吸收；纤维可减少食物在小肠中停留的时间，由于食物中毒素在体内停留时间变短，被身体吸收或者造成其他问题的几率减少。

10. 纸是由纤维素构成的，而 β-葡糖苷酶可以将纤维素降解为葡萄糖。如果你服用了 1 粒药丸后吃这本书，味道将仍然像咀嚼纸一样。那是因为你的味蕾位于口中，而酶在胃中。如果你将书浸到酶溶液中后再享用，那味道要甜得多。

11. 硫酸软骨素分子表面在生理条件下带有许多负电荷，这些电荷彼此排斥，使整个分子形成延展的构象。由于硫酸软骨素是个极性分子，可吸引许多水分子，因此使分子体积增大了。

7 脂质、生物膜和信号转导

1. (a) ω-3；(b) ω-6；(c) ω-6；(d) ω-9，不属于 ω-3 或 ω-6；(e) ω-6。

2. 可在 C-1 和 C-3 处发生取代的 $4\times4=16$ 对脂肪酸残基中只有 10 对是惟一，因为 C-

1和C-3处不同取代基与取代次序相反的该分子是一致的。然而,C-2可以是4种取代基中的任一个,所以总共有$4\times10=40$个不同的三酰甘油。

3. 脂质体是脂双层膜组成的封闭的、内部有空间的囊泡。离子和极性水溶性分子(包括许多药物)被包裹在脂质体的水溶性的内部空间,负载药物的脂质体可以通过血液运输,然后与靶细胞的质膜相融合将药物释放入靶细胞内部。

4. 由于顺式双键的存在使烃链产生一个弯曲,这可防止脂肪酸链靠的太紧密(堆积),另外顺式双键对维持膜的流动性有贡献,反式脂肪酸类似于饱和脂肪酸,没有此结构效应,所以很少在磷脂中出现。

5. 由1个红细胞的膜铺成的单层面积为$[0.890\times10^{12}\mu m^2]/(4.74\times10^9)=188\mu m^2$。由于红细胞表面积只有$100\mu m^2$,所以覆盖红细胞表面积的脂是双层的,即$188/100\approx2$。换言之,红细胞膜是由双层脂构成的。

6. (c)载体应当能够扩散过细胞膜。低温下脂双层呈凝胶态,降低了离子载体的运动速度。曲线的陡峭部分对应的是膜向易流动状态(液晶态)的转变,液晶态下游离的离子载体容易扩散。

7. G蛋白是一个有两种相互转换形式分子开关的蛋白,一个是结合GTP的活性形式,另一种为结合了GDP的失活形式。在正常的G蛋白中,GTP酶活性将活性的G蛋白转化为失活形式。由于Ras蛋白质缺少GTP酶活性,它不能被失活。结果使腺苷酸环化酶的活性继续,延长了对细胞外信号的响应。

8. 可可碱结构上与咖啡因和茶碱有关,包括可可碱在内的甲基化嘌呤抑制cAMP磷酸二酯酶,它是一个可催化cAMP水解为AMP的可溶性酶。这些甲基化嘌呤抑制细胞内信使cAMP降解为AMP,cAMP的作用被延长。再加上狗本身清除摄入可可碱的速度就慢,摄入巧克力导致狗中毒也就不难理解了。

9. IP_3和DAG在它们都促进细胞内的激酶激活上相互补充,激酶转而通过使细胞内靶蛋白磷酸化,而激活它。DAG直接激活蛋白激酶C,而IP_3通过打开内质网膜中的Ca^{2+}通道使Ca^{2+}离子水平升高,并将储存的Ca^{2+}释放到胞质中。增加的Ca^{2+}水平再激活其他激酶,导致某些靶蛋白磷酸化和激活。

10. 胰岛素仍然可以正常地结合胰岛素受体的α亚基,但是由于突变,β亚基缺少酪氨酸-激酶活性和不能催化自动磷酸化或其他磷酸化反应。因此,胰岛素不能引发细胞内响应。更多胰岛素存在也没有效果。

8 核酸

1. 在α螺旋中,第1个氨基酸残基的羧基氧与旋转一圈后的第5个残基的酰胺氢形成氢键,在骨架原子间形成的氢键大致与该螺旋轴平行,从骨架向外伸出的氨基酸侧链不参与螺旋内氢键的形成。在双链DNA中糖-磷酸骨架不参与氢键形成,取而代之是在反平行的两条链中互补碱基之间可形成大致垂直于螺旋轴的2个或3个氢键。

在α螺旋中,单个氢键是很弱的,但是这些键累积的力稳定了该螺旋结构,特别是在一个蛋白质的疏水内部,水不能争夺氢键的氢原子。在DNA中氢键的主要作用是可以让每条链可作为另一条链的模板,尽管互补碱基之间的氢键帮助稳定这一螺旋结构,但在疏水内部的碱基对之间的堆积相互作用对螺旋的稳定性贡献更大。

2. 如果 58%的残基是(G+C),(A+T)残基必定为 42%。因为每 A 都与互补链上的 T 配对,所以 A 残基数等于 T 残基数量。因而 21%或 420 个残基为:T(2000×0.21=420)。

3. (a) DNA 互补链的碱基组成会有很大差别。例如,如果一条链是聚(dA)(100% A),另一条链就应当是聚(dT)(100%)。然而,由于 2 条链互补,每一条链上的(A+T)量是相同的,同样(G+C)量也应当是相同的。

(b) (A+G)=(C+T),互补表明一条链上的每一个嘌呤(A 或 G)在另一条链上都有对应的嘧啶(T 或 C)。

4. DNA 带有遗传信息当然需要稳定保留;mRNA 是合成蛋白质的信息载体,但它只是在需要合成蛋白质时需要,如果它长期稳定存在,那么即使不需要这种蛋白质的时候也会继续合成,这样不但浪费能量也会造成各种疾病,因此大多数 mRNA 是短命的(分钟级);当需要更多蛋白质的时候是通过合成更多 mRNA 来实现的。

5. 是的。在 RNA 和 DNA 中糖-磷酸骨架都含有连接糖残基的磷酸二酯键。

6. (a) 溶液 A 中的 DNA 将首先被完全变性,因为在 20 个碱基对螺旋中的堆积作用力比在 400 个碱基对螺旋中的力小很多。双链末端的 DNA 碱基对只是部分堆积。在短的分子中这种"末端效应"更大。

(b) 在溶液 A 中复性的速率更大。成核作用(形成第 1 个碱基对)是一个限速步骤,单链分子的数目越大,再次形成碱基对的几率越大,因而在溶液 A 中的 DNA(含有 2mol 单链 DNA)将比溶液 B 中的 DNA(含有 0.1mol 单链 DNA)更快地复性。

7. 嗜热菌 DNA 所含 G 和 C 量应比嗜温菌多。由于 G,C 间是 3 个氢键,而 A,T 间是 2 个氢键,所以含(G+C)较多的 DNA 在单位长度双螺旋 DNA 中含有较多的氢键。双链间的氢键结合越多,DNA 热稳定性越强,熔点(T_m)越高。DNA 热稳定性增强是嗜热菌能在较高温度下生存的一个重要因素。

8. 凝胶 α 最能代表预期的带形。由于溴乙锭可以插入到堆积的碱基对间,所以随着溴乙锭浓度的增加,质粒解旋,超螺旋逐渐减少直至变成一个松弛型环状 DNA。松弛型环状 DNA 不如天然质粒结构紧凑,因此,其电泳迁移速度更慢。但溴乙锭浓度进一步增加会诱导正超螺旋产生,使得质粒又变得更加紧凑,迁移速度也逐渐变快。

9. 核小体是由组蛋白和 200 碱基对的 DNA 组成。由于你有一半染色体是从你母亲那继承来的,卵母细胞含有的核小体为:

$$(3.2\times10^{9}\ \text{bp})\times(1\ \text{核小体}/200\text{bp})=8\times10^{6}\ \text{核小体}$$

(你没有从你父亲那继承核小体,因为在精子生成期间核小体被小的、带正电荷的多肽取代)

10. 电泳的 DNA 样品通常是用限制性内切酶进行切割得到的线性片段,因此 DNA 的形状都是均一的。电荷对于 DNA 也是恒定的,因为每一个核苷酸由于磷酸基团都有相同的电荷,所以 DNA 具有均一的形状和荷质比,因此分离仅取决于 DNA 分子大小,小片段电泳快,大片段慢。

11. LDH_3 亚基构成为 H_2M_2,每个亚基都是 1 个单独的基因编码,因此要克隆 LDH_3 必需克隆编码 H 亚基的基因和编码 M 亚基的基因,这是两个单独的实验。每一个基因可以克隆到 1 个表达细胞系内表达得到蛋白,单独的亚基然后进行重组,可以形成四聚体,其中有些就是 LDH_3,然后用非变性凝胶电泳进行分离。

9　DNA 复制和修复

1. 双链都是“重链”DNA：没有；双链都是“轻链”DNA：14/16 或者 87.5%；杂化双链 DNA：2/16 或 12.5%。

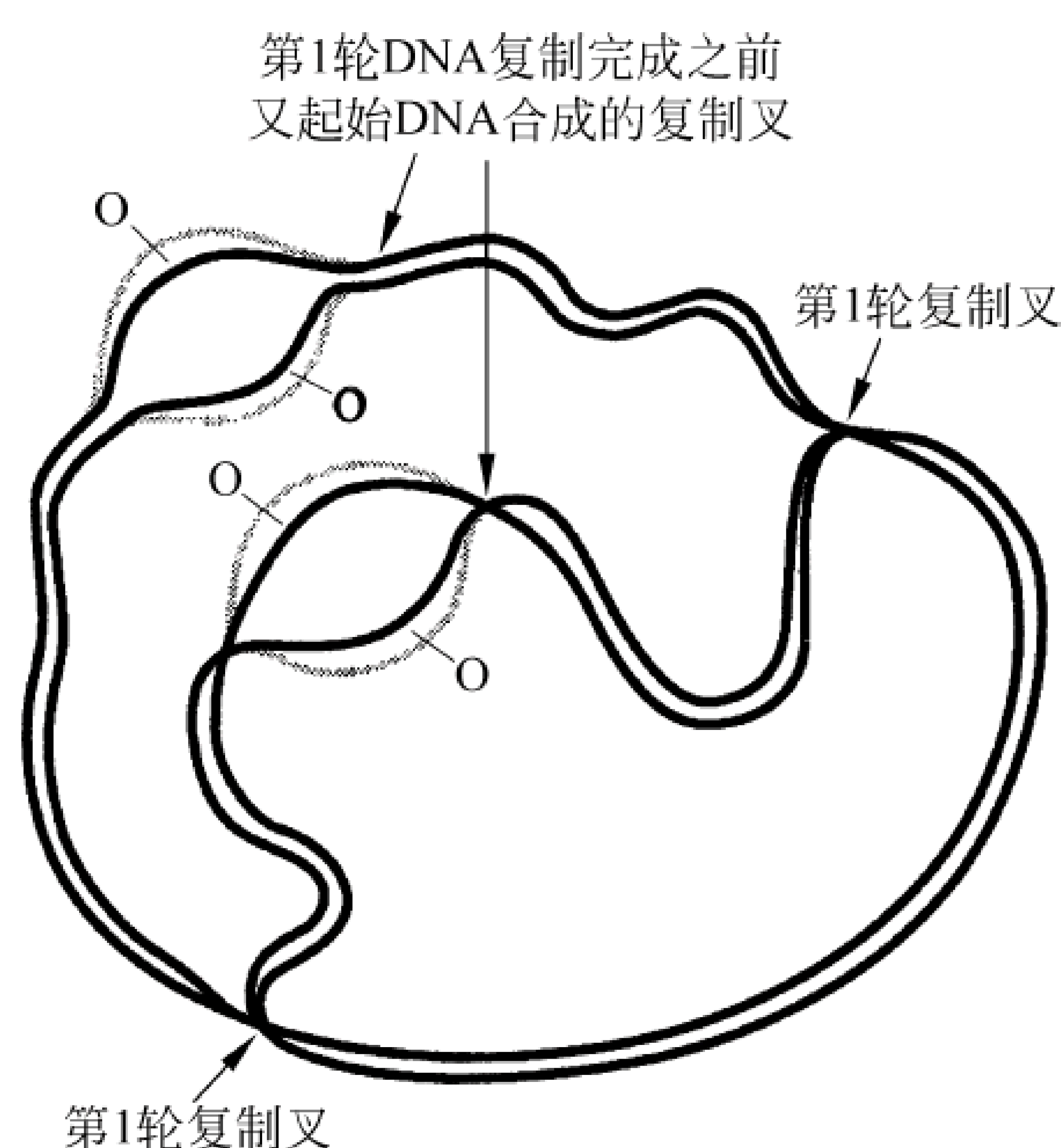
2. (a)不能，因为 DNA 的合成需要 4 种脱氧核苷三磷酸；(b)能，DNA 合成需要 4 种脱氧核苷三磷酸，只要有一种被标记，新合成的 DNA 就能测出放射性；(c)不能，因为在 DNA 聚合酶催化的反应中，只有 α-磷酸上标记^{32}P能出现在新合成的 DNA 中，而 β-磷酸基或 γ-磷酸基上标记的^{32}P都以焦磷酸 PP_i 形式释放了。

3. 非常精确的复制需要一种能够除去 DNA 聚合反应错配核苷酸的校正机制。RNA 引物的合成是在引物合成酶催化下完成的，但该酶没有校正功能，所以比 DNA 合成更容易出错。但由于引物是 RNA，它可以被具有 5′→3′外切活性的 DNA 聚合酶Ⅰ除去，并用精确合成的 DNA 取代，然后再通过 DNA 连接酶将两个冈崎片段连接起来。如果引物是由没有校正活性的引物合成酶合成的 DNA 组成，该 DNA 引物不能被 DNA 聚合酶Ⅰ除去，DNA 复制的错误率在引物合成的部位将是很高的。

4. (a)缺失解开 DNA 链以进行复制的 DNA 解旋酶(DnaB)会致死；(b)缺失 DNA 聚合酶Ⅰ会妨碍 RNA 引物的切除，会致死；(c)SSB 的作用是防止已经分开的单链重新退火，所以 SSB 的缺失将是致死的；(d)RecA 蛋白参与 SOS 反应和同源重组，RecA 缺失将是有害的，但不一定致死。

5. (a) 在复制起点形成两个复制叉，2 个复制叉以相背方向移动直到它们在起点对面的某一点相遇为止。因而，每个复制体复制一半基因组(2.6×10^6 bp)，复制整个染色体需要的时间：$2.6\times10^6/1000 = 2600s = 43min20s$。

(b) 尽管仅有一个起点(O)，但在前一个复制叉到达终点位置之前复制可以再起始。因而在每一个双链 DNA 分子上存在 2 个以上的复制叉。复制 1 个染色体仍旧需要约 43 分钟，但完成每个染色体拷贝的间隔却缩短了。



6. (a) 首先必须假设全部基因组是一个大的线型 DNA 分子，同时假设复制起点位于该染色体的中点。因为复制叉相背移动，每秒钟可复制 60bp，复制整个基因组所需要的时

间为：1.65×10^8 bp/60(bp/s)$=2.75\times10^6$ s$=$764(h)$=$32d

(b) 假设2000个双向复制起点等距离地沿DNA分子分布，同时在所有的起点同时开始复制，该速度为：$2000\times2\times30$bp/s$=1.2\times10^5$ bp/s

复制整个基因组所需要的时间为：1.65×10^8 bp/1.2×10^5 bp/s$=$1375s$=$23min

(c) 再次假设起点等同分布，所有起点同时开始复制所需的速度为：

$$1.65\times10^8\ \text{bp}/300\text{s}=5.5\times10^5\ \text{bp/s}$$

由于从每个起点双向复制，所以每秒钟的总速度为60bp

$$5.5\times10^5\,(\text{bp/s})/60\,(\text{bp/s})=9170(\text{起点})$$

所以为了在5分钟内完成复制，约需要9170个起点。

7. 如果端粒酶活性丧失将会导致每一代细胞分裂时端粒逐渐缩短，最后导致细胞系死亡。人类体细胞的端粒长度随个体年龄的增加而变短，如果在体外将端粒酶引入人体细胞，细胞寿命显著增加。但端粒的逐渐缩短是否是衰老的关键，寿命长短是否取决于与生俱来的端粒的长度？还有待于进一步的研究来揭示。

8. (a) 体外合成使用的单链DNA模板可形成像发卡那样的二级结构，SSB通过结合单链模板可以防止双链结构的形成，使DNA成为DNA聚合酶的一个很好的底物。因此，加入SSB会增加DNA产率。

(b) 因为在高温下进行，模板形成二级结构的可能性小，可提高DNA的产率。由于在65℃高温下，从生长在高温环境下细菌分离出的DNA聚合酶仍然具有活性。但在这个温度下，来自其他细菌的DNA聚合酶的活性比较低，甚至没有活性。

9. 修饰的G不再与C形成碱基对，但它可与T形成碱基对。因此，DNA的1条子代链将含有1个T(修饰碱基对面)。下一轮复制过后，这个T将与A配对，结果最初的G/C将突变为A/T碱基对。

10. 二聚体可以通过切除修复除掉。在解旋酶帮助下UvrABC内切核酸酶将包含嘧啶二聚体的12～13个残基片段切除掉。切后留下的空隙通过DNA聚合酶Ⅰ的作用填充，而最后的切口由DNA连接酶连接。

二聚体也可以通过直接修复来修复。DNA光复活酶与二聚体部位处畸变的双螺旋结合，当DNA-酶复合物吸收光后，二聚化作用反应就被逆转，解离为单个胸腺嘧啶形式。

11. 高突变率发生在含甲基胞嘧啶的区域是由于5-甲基胞嘧啶脱氨的产物是胸腺嘧啶，没有被识别为错误碱基。当由于5-甲基胞嘧啶脱氨导致的错配碱基对T/G被修复后，修复酶可以除去不正确的胸腺嘧啶，或除去正确的鸟嘌呤。当鸟嘌呤被腺嘌呤取代后，生成的A/T碱基对就是一种突变。

12. 聚合酶链式反应通过加热(95℃左右)、冷却(50～60℃)和保温(72℃左右)等改变温度的方法使DNA双链解离、引物结合以及引物延伸，反复进行变性→退火→延伸循环来扩增DNA。由于聚合酶链式反应是在较高温度下进行的，使用耐高温的DNA聚合酶可以避免每一轮扩增时补充新的DNA聚合酶。

13. (a)新合成的链被终止的频率低，所以出现在测序胶上表示被截短的片段带比较淡；(b)链终止频率比较高，所以比较长的片段丰度小；(c)DNA合成的量将会减少，胶上的条带会比较淡；(d)没有影响。

10 转录与 RNA 加工

1. (a)在 α-[^{32}P]ATP 被用作 RNA 聚合酶底物的所有位置处的 mRNA 磷酸二酯骨架的磷酸基团都被标记。

(b) ^{32}P 只出现在 mRNA 分子第 1 个残基为 A 的 5′端(这个残基保持 α 磷酸和 β 磷酸)。而在其他情况下,β-[^{32}P]ATP 被作为 RNA 合成的底物时,β 磷酸和 γ 磷酸以 PP_i 形式释放。

(c) 没有^{32}P 出现在 RNA 链中。在聚合反应中,β 磷酸和 γ 磷酸以 PP_i 形式释放。RNA 分子 5′末端的 A 残基的 γ 磷酸在加帽过程中被去除。

2. (a) 由于一旦 RNA 聚合酶进行 RNA 延伸反应,另一个 RNA 聚合酶就会紧接着结合到 DNA 模板上形成转录复合物起始转录。假定转录复合物紧密排布在 DNA 模板上,可以认为每秒都有一个 RNA 聚合酶完成一个转录物并离开该 DNA 模板。因此,当整个基因都负载着转录复合物时,每分钟从一个 6000bp 基因最多可生产出 60 分子 RNA。

(b) 因为每一个转录复合物覆盖了 70bp 时,一次同时结合于此基因上的最多转录复合物约为:6000bp/70bp ≈ 86 个转录复合物。

3. 由于 RNA 聚合酶缺少校正活性,所以转录错误率远远高于 DNA 复制的错误率,但是错误的 RNA 分子将不可能影响细胞的生存,因为从一个基因合成的 RNA 的绝大多数拷贝是正常的。

就 mRNA 分子来说,按照含有错误的 mRNA 转录物合成的错误的蛋白质的数量占所合成蛋白质总数的百分比很小。另外,由于大多数 mRNA 分子的半衰期很短,所以在转录过程中生成的错误可以很快去除。

4. 如果 3′-脱氧腺苷-5′-三磷酸被 RNA 聚合酶错当成 ATP,它将会进入到生长中的 RNA 链,然而因为 3′-脱氧腺苷-5′-三磷酸缺少一个 3′-羟基基团,在聚合反应中它不能与下一个核苷三磷酸反应,因而在转录过程中将 3′-脱氧腺苷-5′-三磷酸引入会导致提前链终止,同时如果该药品大量存在,细胞将死亡。

5. 不能。真核基因的启动子在恰当位置含有允许原核 RNA 聚合酶精确起始转录的合适序列那是绝对不可能的事;反之,原核基因的启动子在恰当位置含有允许真核 RNA 聚合酶Ⅱ精确起始转录的合适序列那也是绝对不可能的事。

6. 不能。1 个典型的真核细胞的丙糖磷酸异构酶基因含有内含子。原核细胞不含剪接体,将不能正确地加工初始转录物。因此,该 RNA 的翻译将产生 1 个畸变的蛋白质片段。

7. 不适用。由基因组 DNA 序列预测出的 RNA 序列是 RNA 初级转录物。然而,纯化的 tRNA 序列测定表明 RNA 初级转录物的许多核苷酸转录后都被特异修饰了。同样道理也适用于真核生物。

8. (a)由于 *E. coli* 基因平均长度为 1kb(1000bp),4000 个基因就是 DNA 的 4000kbp,没有被转录的 DNA 的百分比为:(600kb/4600kb)×100%=13%没被转录的 DNA 主要由启动子和调控转录起始的区域组成。(b)由于哺乳动物基因产物大小类似于细菌基因产物,所以一个典型哺乳动物基因的外显子中的 DNA 也应当为 1000bp,因此总的外显子 DNA 量为:

$$5\times10^4\ 基因\times1.0\text{kb}/基因=5\times10^4\text{kb}$$

哺乳动物基因组中外显子 DNA 的百分比约为：

$$(5\times10^4\,\text{kb}/3\times10^6\,\text{kb})\times100\%=1.7\%$$

9. 要插入细菌质粒指导合成 α 链的 DNA 序列应该是 cDNA，其序列与 α 链的 mRNA 序列互补。以 mRNA 作为模板，在反转录酶催化下可合成 cDNA。

10. 四膜虫的 rRNA 的初级转录物经过一个自剪接反应除去了它的插入序列，因为在这一反应中转录物是被永久地修饰了，因而它不是一个真正的催化剂。

核糖核酸酶 P 的 RNA 组分能够剪接 tRNA 前体分子，并且在反应结束时仍旧保持不变，因而它称得上是一个真正的催化剂。

11. 由于玉米中丙糖磷酸构酶基因含有约 3400 个碱基对，如果剪接体在第 1 个内含子处组装，那么还有 2900 个碱基对需要转录。转录该 2900 个碱基对所需要的时间为 97 秒（2900 核苷酸÷30 核苷酸/秒）。所以该剪接体在第 1 个内含子转录后立即组装，而且直到整个基因转录完成时才开始剪接，该剪接体应当至少要稳定 97 秒。

12. 在成熟期间，真核细胞的 mRNA 前体的 3′端通过加上一个聚 A 尾巴而修饰。当一个来自细胞萃取液成分的混合液通过柱子时，聚 A 尾巴将与柱上寡 dT 杂交，而混合液中的其他成分将直接通过柱子流出。而结合的带有聚 A 尾巴的成熟 mRNA 可通过改变 pH 或改变缓冲液的离子强度洗脱下来。通过这样方法可以破坏 A 核苷酸和 T 核苷酸之间的氢键。

11　蛋白质合成

1. 由于 Ser 有 6 个密码子：UCU、UCC、UCA、UCG、AGU 和 AGC。其中 UCU、UCC、UCA、UCG 和 AGC 中的 C 突变成了 U 后，原密码子变成了 UUU（Phe）、UCU（Ser）、UUC（Phe）、UUA（Leu）、UUG（Leu）和 AGU（Ser）。

所以，原本 Ser 占据的位置可能被 Phe 或 Leu 占据。

2. 其中的（a）Phe 和（b）His 可能只存在 1 种 tRNA。因为 $tRNA^{Phe}$ 的反密码子是 GAA，因此它可以通过摆动配对与 Phe 的密码子 UUU 和 UUC 配对。$tRNA^{His}$ 的反密码子是 GUG，它可以与 His 的密码子 CAC 和 CAU 配对。但由于 Leu 有 6 种简并密码子（UUA、UUG、CUU、CUC、CUA 和 CUG），根据摆动规则，至少需要 3 种反密码子（UAA、IAG 和 CAG 或 UAG），即至少需要 3 种 $tRNA^{Leu}$。

3. 该酵母使用的丙氨酸密码子为 GCA、GCC 和 GCU，而不是 GCG，因为 I 可以与 A、C 或者 U 配对，但不能与 G 配对。

4. 蛋氨酸有 2 个 tRNA，一个是起始 tRNA（$tRNA_f^{Met}$），另一个是把蛋氨酸掺入到多肽内部序列的 $tRNA^{Met}$。在转录起始复合物中，只有 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 能被起始因子 IF-2 识别，并与位于核糖体 P 位的起始密码子 AUG 结合在一起。而处于 mRNA 内部的 AUG 密码子只能与 Met-$tRNA^{Met}$ 结合，将未甲酰化的蛋氨酸掺入到多肽序列内部。

5. A 变为 G 将使赖氨酸密码子 AAA 和 AAG 分别变为 GAA 和 GAG，这 2 种密码子都编码谷氨酸。这将导致蛋白质中酸性残基取代碱性残基。如果改变发生在蛋白的表面，它可能不影响蛋白质的结构或功能，但如果改变涉及内部的离子配位，催化残基，或其他的重要残基，其影响可能是巨大的。

6. 将已知蛋白质的 mRNA 添加到裂解物中。在 1 分钟或 2 分钟后，加入嘌呤霉素提前

终止翻译。分析合成多肽的序列以确定它们是否对应于蛋白质的C-或N末端。或者,将被核素标记的仅出现在蛋白质终点附近的1个氨基酸(以氨酰-tRNA)加入到裂解物中,随后检测标记是否整合进了多肽。

7. 不能,因为在*E. coli*细胞中正确翻译起始需要该mRNA 5′端非翻译区的SD序列。由于真核生物核糖体不需要SD序列,所以来自植物的mRNA不可能含有SD序列。

然而,如果编码植物mRNA的基因的部分与细菌的SD序列融合,然后针对植物蛋白质的开放读框将有可能在细菌细胞中被正确翻译。

8. 每一个rRNA基因的转录物是一个直接被整合到核糖体的rRNA分子。由于细胞需要大量核糖体,为了组装核糖体就需要多拷贝的rRNA基因。相反每一个核糖体蛋白质基因的转录物是一个可以被翻译多次的mRNA,由于RNA至蛋白质的这一放大作用,所以对每一个核糖体蛋白质基因的需求比对rRNA基因的需求要少得多。

9. (a)有无嘌呤霉素,合成出的所有蛋白质都具有相同的N-末端氨基酸;(b)没有嘌呤霉素的实验中,所有蛋白质都具有相同的C-末端氨基酸;而在有嘌呤霉素时,合成的部分肽链终止于不同的C-末端氨基酸;(c)有嘌呤霉素存在时,平均链长变短,因为肽链合成提前终止了。

10. 每个mRNA序列都可按照3种不同读框翻译。对于第1个mRNA序列,可能的密码和多肽序列为:

读框1　5′〰|C C G|G C U|A A G|C C A|U G A|C U A|G C〰3′
　　—Pro—Ala—Lys—Pro　STOP

读框2　5′〰C|C G G|C U A|A G C|C A U|G A C|U A G|C〰3′
　　—Arg—Leu—Ser—His—Asp　STOP

读框3　5′〰C C|G G C|U A A|G C C|A U G|A C U|A G C|〰3′
　　—Gly　STOP

对于第2个mRNA序列,可能的密码和多肽序列为:

读框1　5′〰|GCU|AGU|CAU|GGC|UUA|GCC|GG〰3′
　　—Ala—Ser—His—Gly—Leu—Ala—Gly—

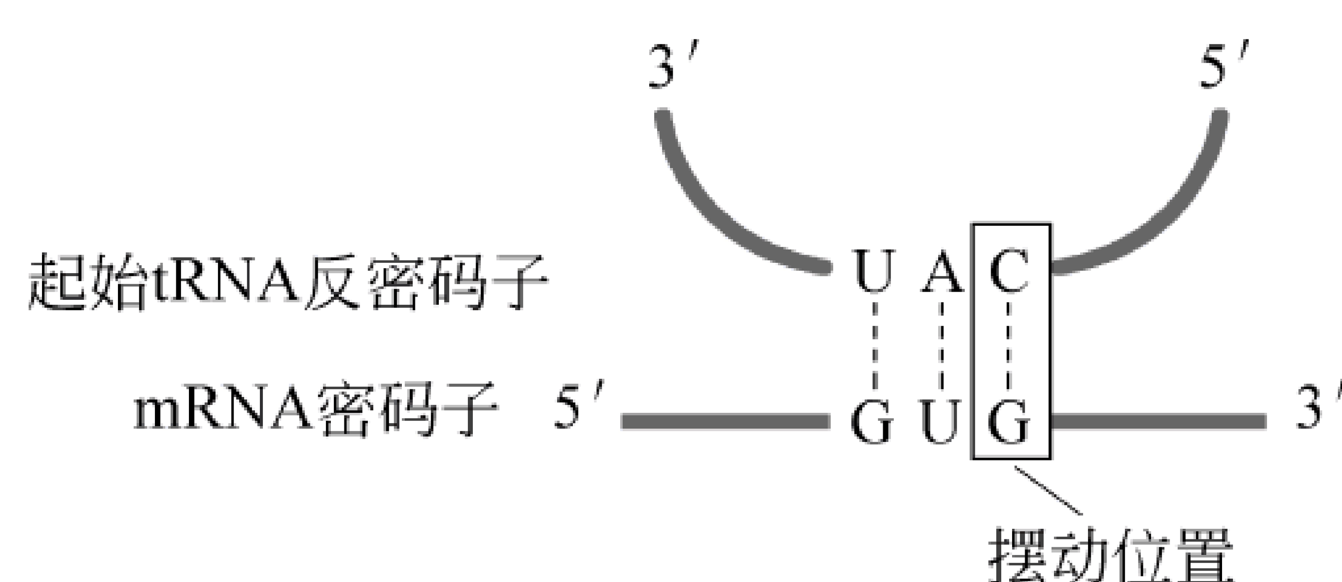
读框2　5′〰G|CUA|GUC|AUG|GCU|UAG|CCG|G〰3′
　　—Leu—Val—Met—Ala　终止

读框3　5′〰GC|UAG|UCA|UGG|CUU|AGC|CGG|〰3′
　　终止

由于只有1个没有终止密码子的读框能够编码1个多肽,即第2个mRNA序列为实际的转录物。该mRNA编码的多肽的序列为:

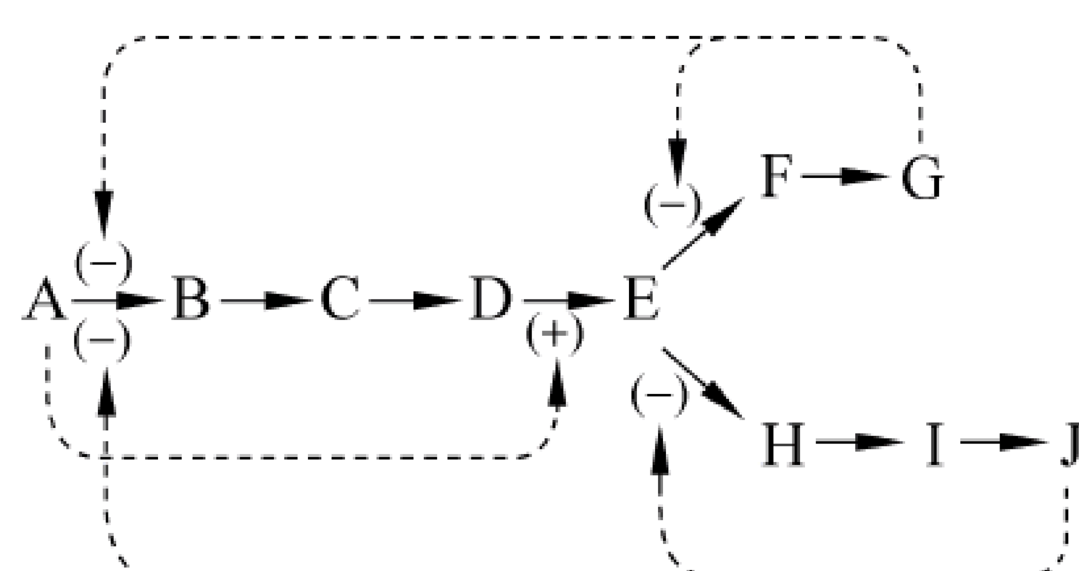
—Ala—Ser—His—Gly—Leu—Ala—Gly—

11. 根据"合成后的蛋白质在N-端总含有蛋氨酸",反密码子应当是CAU,才能携带蛋氨酸。因此,通过密码子5′-核苷酸与反密码子3′位之间形成一个碱基对G/U,起始tRNA反密码子与GUG配对。相互作用与摆动无关,因为反密码子的5′是摆动位置。



12 代谢导论

1. (a)见附图。(b)共同途径中第一步被 G 或 J 抑制可防止途径中中间产物的不必要堆积。当 G 或 J 充足时,仅少数分子 A 进入途径。通过调控分支点后的酶,G 或 J 只抑制它自己的产出,而不抑制另一途径的产出。



2. 使代谢过程区室化可使每个途径的底物和产物以最适浓度单独存在于每个区室内。另外,途径中酶隔开也可做到每个途径单独调控,而不受来自其他途径的调节剂的干扰。

3. 为了使反应按照 A→B 方向进行,ΔG 值必须为负值。

根据 $\Delta G = \Delta G^{\ominus\prime} + RT\ln([B]/[A])$

当平衡时 $0 = 20kJ/mol + (8.3145J/(K \cdot mol))(298K)\ln([B]/[A])$

$$[B]/[A] \approx 0.0003, \quad [A]/[B] = 3333/1$$

因此,反应物/生成物的比例至少要大于 3333/1。

4. (a) 虽然 ATP 被快速用于例如肌肉收缩和膜转运等需能地方,但它也可以由 ADP 和 P_i 通过中间代谢途径快速再合成。再合成所需要的能量可由糖、脂肪和氨基酸降解或能量储存分子例如磷酸肌酸提供。随着这一快速再循环,ATP 和 ADP 总计 50g 对于身体需要的化学能量也足够了。

(b) ATP 的作用是自由能传送者,而不是能量储存分子。就像(a)指出的那样,ATP 不能储存,但可快速被用于需能的反应中。

5. 在 pH6.0 时,磷酸基团比在 pH5.0 时更容易离子化,结果增强了它们的静电排斥,因此增加了水解的 ΔG(使之更负)。

6. 无机焦磷酸酶催化的 PP_i 放能水解($\Delta G^{\ominus\prime} = -19.2kJ/mol$)驱动脂肪酸活化。

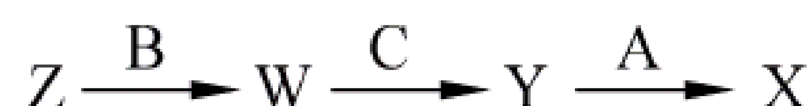
7. 肌酸激酶催化如下反应:ATP+肌酸⟷磷酸肌酸+ADP

在细胞中,该反应处于平衡且是可逆的。因此,磷酸肌酸的浓度对[ATP]的变化非常敏感。当 ATP 含量丰富时,合成磷酸肌酸。当[ATP]下降时,逆反应发生,磷酸肌酸可以将它的磷酸基团转移给 ADP 生成更多的 ATP。

8. pH 为 7.0 时,$E^{\ominus\prime} = 0.82V$。因此,还原反应更有利于在 pH 为 0 时发生(其中 $E^{\ominus\prime} = 1.23V$),因为具有更正的还原电位和更负的 ΔG。根据质量作用定律,其中一个反应物

(H^+)浓度的升高将使平衡向产物方向移动。因此,降低 pH 从而增加$[H^+]$,将有利于氧气的还原。

9.



10. (a)由酶 Y 催化的步骤可能是主要的控制点,因为这步偏离平衡最远(是个不可逆步骤);(b)抑制酶 Z 会造成反应产物 D 的浓度降低,造成反应底物 C 的积累。A,B 的浓度不会变化,因为酶 X 和酶 Y 催化的步骤不受影响。累积的 C 不会转变回 B,因为酶 Y 催化的反应是不可逆的。

13　糖酵解与戊糖磷酸途径

1. (a)2 个 ATP;(b)2 个 ATP;(c)2 个 ATP;(d)5 个 ATP(2 个来自蔗糖降解的果糖,3 个来自葡糖-1-磷酸,葡糖-1-磷酸作为起始原料等于少消耗了 1 个 ATP)。

2. (a) $\Delta G' = \Delta G^{\ominus\prime} + RT\ln([\text{甘油醛-3-磷酸}]/[\text{磷酸二羟丙酮}])$

$$2410\text{J/mol} = 7560\text{J/mol} + 8.3145\text{J/(mol·K)} \times 310\text{K}\ln([\text{甘油醛-3-磷酸}]/[\text{磷酸二羟丙酮}])$$

$$[\text{甘油醛-3-磷酸}]/[\text{磷酸二羟丙酮}] = 0.135$$

因此,[磷酸二羟丙酮]/[甘油醛-3-磷酸]=7.4

(b)[甘油醛-3-磷酸]为 0.027mmol

3. 在标准条件下醛缩酶催化反应的 $\Delta G^{\ominus\prime\prime}$为+23.9kJ/mol,然而心肌中果糖-1,6-二磷酸、磷酸二羟丙酮及甘油醛-3-磷酸的浓度要比标准条件下假设的 1mol/L 有很大差别。实际上在细胞浓度下的 $\Delta G'=-0.23$kJ/mol,所以醛缩酶反应能够按照生成磷酸二羟丙酮和甘油醛-3-磷酸方向进行。

4. 在这 2 个酶催化的反应中,当 ATP 的 γ-磷酰基被转移时都要切断 γ-磷原子与 β-磷酰基的氧之间的键,由于类似物与 ATP 竞争酶的活性部位,而类似物又不能被切断,因此可抑制这 2 个酶。

5. 在缺氧条件下的剧烈肌肉活动中,肌细胞惟一可利用的能量就是葡萄糖转变为乳酸代谢产生的能量。由于乳酸可转换为丙酮酸,当氧充足时丙酮酸再被氧化;或经 Cori 循环将乳酸转运到肝,经糖异生途径生成葡萄糖重新被肌细胞利用,所以葡萄糖并没有被浪费。这一代谢灵活性为人提供了更强的适应环境的能力。

6. ^{14}C 标记在甘油醛-3-磷酸的 C-1 上,生成的果糖-1,6-二磷酸是醛缩酶催化甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮缩合反应的产物。而甘油醛-3-磷酸经磷酸丙糖异构酶催化转换为 C-3 为^{14}C 标记的磷酸二羟丙酮,所以,^{14}C 出现在果糖-1,6-二磷酸中的 C-3 和 C-4 上。

7. (a)葡萄糖$+2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2$ 丙酮酸$+2NADH+2ATP+2H_2O$;(b)葡萄糖$+2NAD^+ \longrightarrow 2$ 丙酮酸$+2NADH+2H^+$;(c)砷酸盐存在时,虽然糖酵解可继续进行,但没有能量 ATP 直接产生。所以,砷酸盐是一种毒药。

8. (a)ATP 既是磷酸果糖激酶-1 的底物,又是它的抑制剂,高浓度 ATP 变成了酶的别构抑制剂,使得曲线右移;AMP 是酶的别构激活剂,AMP 的存在会缓解 ATP 对酶的抑制作用,所以使曲线左移。(b)F2,6P 是 PEK-1 的别构激活剂,由于在 F2,6P 存在下对 F6P

的表观 K_m 降低,所以 PEK-1 的活性增加。

9. 果糖 1,6-二磷酸是糖酵解第 3 个反应的产物,它起着催化第 10 步反应的丙酮酸激酶的前馈激活剂的作用。这一调节机制能够确保代谢物一旦通过糖酵解磷酸果糖激酶-1 步骤,它们就能够通过糖酵解途径。

10. 葡糖-6-磷酸、甘油醛-3-磷酸、果糖-6-磷酸。

11. 核酮糖-5-磷酸转化为木酮糖-5-磷酸的反应是消旋反应,消旋使得 C-3 手性中心的构型发生转换。而核酮糖-5-磷酸异构化为核糖-5-磷酸时是通过双键位置的改变将酮糖转化醛糖的。

12. 修复损伤组织需要细胞增殖和合成瘢痕组织,NADPH 是合成胆固醇和脂肪酸(细胞膜成分)所必需的,而核糖-5-磷酸是合成 DNA 和 RNA 所必需的。因为戊糖磷酸途径是 NADPH 和核糖-5-磷酸的主要来源,所以损伤组织的反应就是通过增加戊糖磷酸途径中酶的合成水平来满足对这些产物的需求。

13. (a) 以 NADPH 形式生成的还原力是构建完整红细胞膜所必需的。而 NADPH 是戊糖磷酸途径的主要产物,葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏将抑制该途径,导致 NADPH 的水平降低,使得红细胞膜在某种药物分子存在下易受到破坏性的氧化过程,有可能造成红细胞裂解。

(b) 有氧糖酵解可以由葡萄糖降解产生 NADH 和 ATP。然而,红细胞中无氧糖酵解产生乳酸和 ATP,但没有净还原力生成(NADH 在乳酸脱氢酶反应中重新被氧化为 NAD^+)。因此,糖酵解被用于产生 ATP,而戊糖磷酸途径应当提供 NADPH。

14 柠檬酸循环

1. 发生丙酮酸脱氢酶反应后,(b)和(c)将产生$^{14}CO_2$,因为葡萄糖的 C-3 和 C-4 原子均成为甘油醛-3-磷酸的 C-1 原子,然后生成丙酮酸。丙酮酸脱氢酶催化丙酮酸的 C-1 生成$^{14}CO_2$。

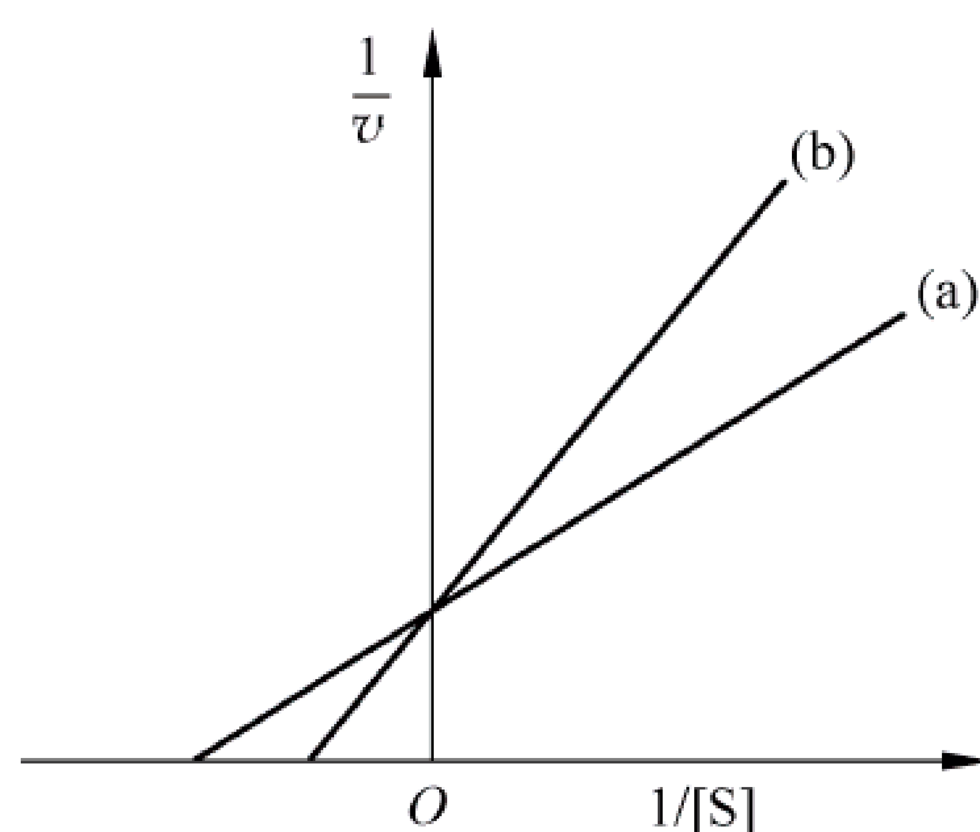
2. (a)柠檬酸循环氧化反应产生的 NADH 必须重新形成丙酮酸脱氢酶复合物催化反应所需要的 NAD^+ 形式。当 O_2 水平降低时,只有很少的 NADH 被 O_2 氧化(经氧化磷酸化),NAD^+ 少导致丙酮酸脱氢酶复合物的活性降低。(b)由于丙酮酸脱氢酶激酶催化丙酮酸脱氢酶复合物磷酸化,使其失活,所以,抑制了激酶可使得更多的丙酮酸脱氢酶处于活性形式,丙酮酸脱氢酶复合物催化丙酮酸转化为乙酰 CoA,由此可减少乳酸中毒症。

3. 第 1 轮循环:0;第 2 轮循环:1/2 原始强度;第 3 轮循环:1/4 原始强度。

4. 维生素 B_1(硫胺素)是辅酶硫胺素焦磷酸的前体,而硫胺素焦磷酸是丙酮酸脱氢酶复合物和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物的辅助因子,缺乏维生素 B_1 使这 2 种酶的活性丧失,也就降低了丙酮酸转换为乙酰 CoA 和 α-酮戊二酸转换为琥珀酰 CoA 的速率,从而导致丙酮酸和 α-酮戊二酸水平的升高。

5. 顺乌头酸酶被氟柠檬酸抑制,导致柠檬酸水平升高,而由异柠檬酸至草酰乙酸后续的所有柠檬酸循环中间物水平都降低。由于至少高水平的柠檬酸可以部分克服氟柠檬酸对顺乌头酸酶的抑制,可使循环以一定水平运作。

6. (1):



(2) 可以,抑制效应能被降低。琥珀酸是琥珀酸脱氢酶的底物,而丙二酸是竞争性抑制物。这种竞争性抑制作用能够通过增加底物浓度来克服。加入草酰乙酸可以增加柠檬酸循环中各中间产物的浓度,当然也包括琥珀酸。

7. 柠檬酸循环中的延胡索酸酶的缺乏导致延胡索酸以及之前的琥珀酸和 α-酮戊二酸的浓度异常高,使得这些分子随尿液排出。

8. (a)10ATP;7.5ATP 来源于 3NADH 的氧化,1.5ATP 来源于 $FADH_2$ 的氧化,1ATP 来自于由 CoA 合成酶催化的底物水平磷酸化。(b)12.5ATP;10ATP 来源于乙酰 CoA 经柠檬酸循环的氧化,2.5ATP 来源于丙酮酸脱氢酶复合物催化反应生成的 NADH 的氧化。

9. 柠檬酸循环的中间物是多步反应的催化剂。1 个氨基酸降解的柠檬酸循环中间物可以增强循环的催化活性,但是不会改变总反应的化学计量(乙酰 CoA $\longrightarrow$ $2CO_2$)。为了能够进行氧化,柠檬酸循环中间物必须退出循环并转变成乙酰 CoA 后,以底物形式再重新进入循环才能被彻底氧化。

10. (a)激活丙酮酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶,因此可促进柠檬酸循环;(b)ATP 抑制丙酮酸脱氢酶、柠檬酸合酶和异柠檬酸脱氢酶,所以降低 ATP 浓度将促进柠檬酸循环;(c)增加异柠檬酸,等于增加催化剂,所以增加它的浓度将促进整个柠檬酸循环。

11. (a)不能由乙酰 CoA 净合成草酰乙酸,因为进入柠檬酸循环的乙酰基的 2 个 C 在异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应中又以 2 个 CO_2 形式释放出去了;(b)草酰乙酸可以通过丙酮酸羧化酶催化的反应获得补充,由此可以净合成草酰乙酸。在某些哺乳动物组织中这是一个主要的添补反应。


$$丙酮酸 + CO_2 + ATP + H_2O \longrightarrow 草酰乙酸 + ADP + P_i$$

在许多植物和细菌中草酰乙酸是通过磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶反应补充的。


$$磷酸烯醇式丙酮酸 + HCO_3^- \longrightarrow 草酰乙酸 + P_i$$

许多生物可以通过乙醛酸途径将乙酰 CoA 转化为苹果酸和草酰乙酸。

12. (a) 2 分子乙酰 CoA 经柠檬酸循环产生 20ATP,而经乙醛酸循环可生成 6.5ATP(2 分子 NADH 和 1 分子 QH_2 氧化)。

(b) 柠檬酸循环的最主要功能是氧化乙酰 CoA 来生成 ATP 和富含能量的还原型辅酶 NADH 和 QH_2;而乙醛酸循环的主要功能不是生产 ATP,而是将乙酰基基团转化为用于生成葡萄糖的 4 碳分子草酰乙酸。

15 糖原代谢和糖异生

1. 肌肉中缺乏糖原磷酸化酶使得糖原无法降解为葡萄糖，葡萄糖不足影响了糖酵解生成 ATP 的量，不能补充肌肉收缩所需要的 ATP，因此 ADP 和 P_i 水平增加。因为肌肉内没有可利用的来自糖原的葡萄糖，所以没有乳酸产生。

2. (a)没有充分的果糖-6-磷酸酶活性必然导致细胞内的果糖-6-磷酸堆积，这将抑制糖原磷酸化酶，并激活糖原合酶。这会防止肝糖原被代谢，结果导致糖原储备增加（肝的增大）和血糖水平降低（低血糖）。(b)缺乏去分支酶导致带有短分支、有缺陷的糖原分子堆积，由于这些分子不能被降解，所以可降解的糖原少很多，不足以满足葡萄糖需要。由于损伤了糖原降解作用导致低血糖水平。(c)没有充足的肝糖原磷酸化酶活性将导致肝糖原堆积，因为该酶由糖原链的非还原端切下葡萄糖分子。由于损伤了糖原降解作用导致低血糖水平。

3. (a)在激烈运动前食用几天高糖类饮食可以增加体内糖原（主要是肌糖原）的储备，糖原将能够提供运动所需能量；(b)可能没有益处，因为棒糖最初会导致胰岛素水平的快速增加，从而导致血液中葡萄糖水平降低和肝中糖原储备的增加。

4. (a) 由葡糖-6-磷酸合成糖原需要 1 个磷酸酐键的能量（PP_i 水解），而糖原经磷酸解反应降解至葡糖-6-磷酸只需 1 个无机磷酸，没有消耗高能磷酸键。

(b) 肌糖原提供给肌肉的 ATP 要比肝糖原作为葡萄糖源提供的 ATP 多 1 个。因为肝糖原经磷酸解等反应降解至葡萄糖，并没有消耗 ATP，但转运到肌细胞后必须要在己糖激酶作用下消耗 1 分子 ATP 后生成葡糖-6-磷酸。然而，肌糖原在糖原磷酸化酶催化下不消耗 ATP 可直接降解为葡糖-1-磷酸，然后再转换为葡糖-6-磷酸。

5. (a) 肌肉中来自糖酵解或氨基酸降解的丙酮酸经转氨作用生成丙氨酸，丙氨酸被转运到肝脏，通过与 α-酮戊二酸的转氨作用重新生成丙酮酸，经糖异生途径丙酮酸被转换为葡萄糖，葡萄糖再返回到肌肉。

(b) 在 Cori 循环中将丙酮酸还原为乳酸时需要 NADH，但葡糖-丙氨酸循环中将丙酮酸转换为丙氨酸时不需要 NADH。因此葡糖-丙氨酸循环使得肌肉中可利用的 NADH 经氧化磷酸化生成更多的 ATP。

6. (a) 糖酵解加速运转，丙酮酸和 NADH 的增加导致乳酸的增加。

(b) 乳酸经丙酮酸转化为葡萄糖，使乳酸浓度下降。这个糖异生过程比较慢，因为丙酮酸的生成受 NAD^+ 的可利用性的限制，同时乳酸脱氢酶（LDH）催化的反应有利于乳酸的生成，另外，由丙酮酸转化为葡萄糖需要能量。

(c) 因为乳酸脱氢酶催化的反应平衡更有利于乳酸的生成。

7. (a) 在饥饿期间糖原耗尽后，最初乳酸、甘油和丙氨酸作为合成葡萄糖的前体，当饥饿持续时，肌肉蛋白被降解为氨基酸，充当糖异生前体。

(b) 肌肉剧烈运动需要高速率的无氧糖酵解，导致血液中出现大量乳酸，乳酸被肝吸收被转换为丙酮酸，然后用于葡萄糖合成（Cori 循环）。

8. 摄入的乙醇经醇脱氢酶催化转化为乙醛：



$$乙醇 + NAD^+ \longrightarrow 乙醛 + NADH + H^+$$

反应中产生的 NADH 导致细胞内 $NADH/NAD^+$ 比增加，NADH 浓度增加分别驱动乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶催化的反应：


丙酮酸 + NADH + H^+ ⇌ 乳酸 + NAD^+


草酰乙酸 + NADH + H^+ ⇌ 苹果酸 + NAD^+

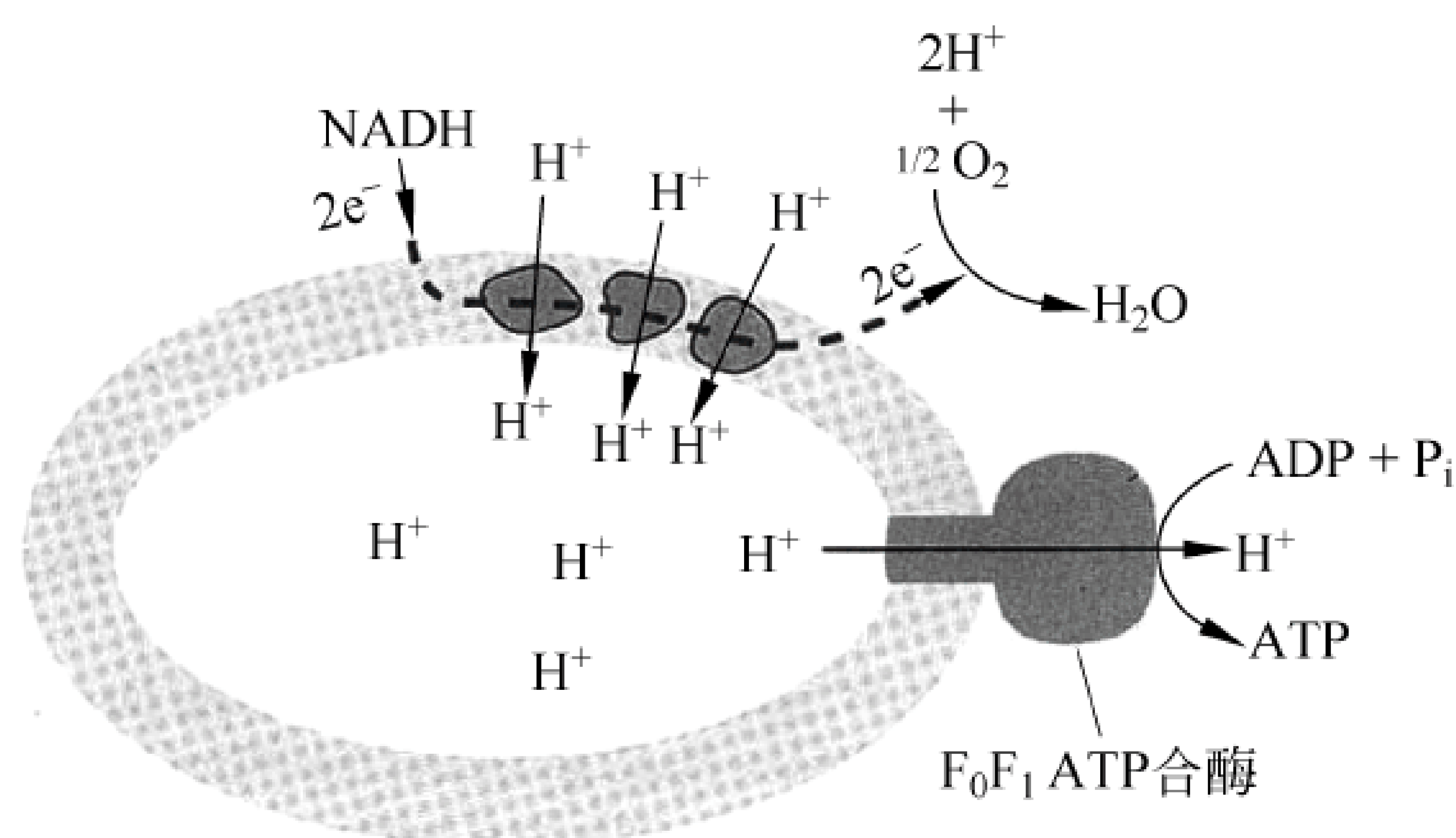
结果丙酮酸和草酰乙酸浓度下降,使得糖异生受阻,导致血糖水平急剧降低。

9. 由丙酮酸经糖异生途径合成葡萄糖需要2NADH、4ATP和2GTP。其中NADH和GTP可直接由柠檬酸循环产生,而ATP可由NADH和$FADH_2$经氧化磷酸化产生。

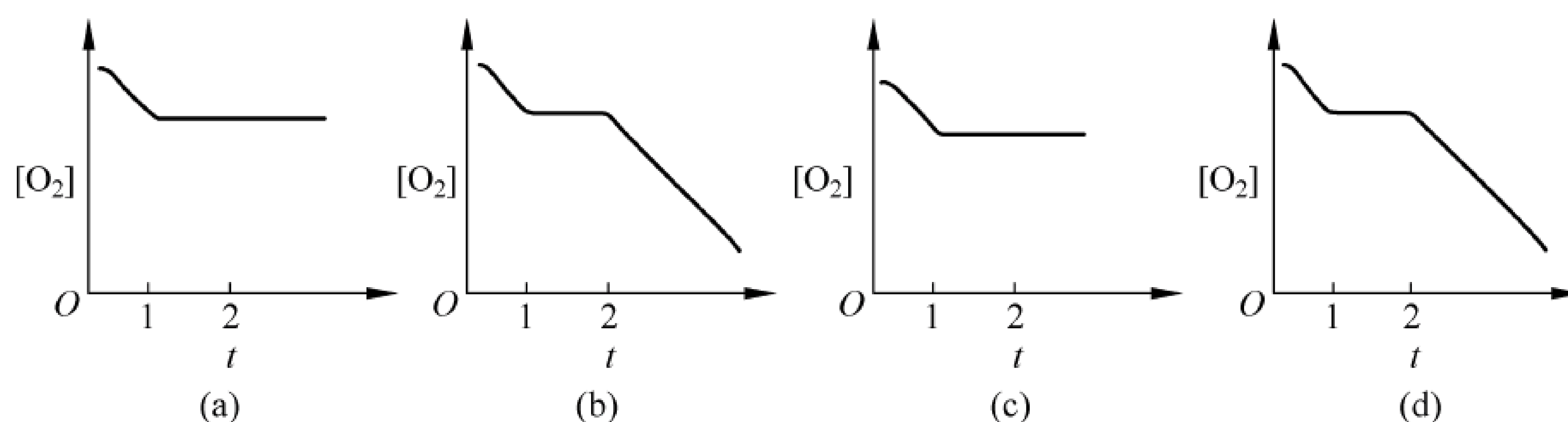
10. 会阻断丙酮酸经糖异生转化为葡萄糖的过程。因为生物素是催化丙酮酸羧化生成草酰乙酸反应的丙酮酸羧化酶的辅基,加入的抗生物素蛋白对生物素的亲和力高,使得反应缺乏生物素而中断。

16 电子传递与ATP合成

1. 电子传递链的蛋白质镶嵌于线粒体的内膜,当膜的内侧被置于外侧时,氧化还原酶的质子泵将泡外H^+运送到亚线粒体泡内(内部的pH下降),同时将电子传递给氧气,此时,ATP合酶的F_1组分定位于小泡外侧,由于存在质子浓度梯度,H^+通过F_0通道转移到小泡的外侧,于是在小泡外侧可以合成ATP。悬浮液pH上升时ATP合成增加。



2.



(a) O_2消耗停止,因为安密妥抑制了复合物Ⅰ中的电子传递。

(b) 来自琥珀酸的电子绕过安密妥的阻遏,进入位于复合物Ⅱ的电子传递链,恢复经由复合物Ⅲ和Ⅳ的电子传递。

(c) CN^-抑制复合物Ⅳ的电子传递发生在电子由琥珀酸进入电子传递链之后。

(d) 寡霉素抑制了氧化磷酸化,因此也就阻止了氧的消耗。而DNP使电子传递和氧化磷酸化解偶联,因此重新开始消耗氧气。

3. (a)10个质子;2.5ATP;P/O=2.5;(b)6个质子;1.5ATP;P/O=1.5;(c)2个质子;0.5ATP;P/O=0.5。

4. (a)复合物Ⅲ,由于缺少细胞色素c,阻止了电子进一步传递;(b)没有反应发生,因

为没有接收来自 NADH 的电子的复合物Ⅰ；(c)O_2；(d)细胞色素 *c*,缺少复合物Ⅳ阻断了电子进一步流动。

5. (a) 当 ATP 无法由 ADP 合成时,氧气消耗停止。这是由于电子传递和质子转移无法独立进行。因此,当质子梯度高达电子转运的自由能不足以使其他转运质子跨过线粒体内膜的时候,电子转运就会停止。

(b) 当加入 ADP 后,就可以合成 ATP。氧消耗量随之恢复,因为 ATP 合酶降低了质子浓度梯度,从而使得质子跨过线粒体内膜的自由能降到电子传递可继续的程度。

6. UCP-2 将质子漏回到线粒体,降低了质子动力。食物代谢提供了电子传递所需的能量,电子传递转而又制造了质子梯度,该梯度被用来生产 ATP。UCP-2 水平升高使得组织代谢效率低下(就是说每克食物代谢生产的 ATP 少)。结果必须要使更多的糖、脂肪和蛋白质代谢以满足基本代谢需要,这可"烧掉"更多的卡路里,而有可能使人减肥。

7. 生成 1 个 ATP 约需要 30.5kJ,所以 ATP 的最大产量取整数时为 3,实际产生 1 个 ATP,因此该过程的效率为 33.3%。

8. (a) 需要水解的 ATP 量为：7000kJ/30.5(kJ/mol)＝230mol。

(b) 230mol×507g/mol＝116 610g≈117kg。

(c) 由于每天需要 230mol ATP,0.1molADP 必须循环 230/0.1＝2300(次)。

9. 由于使用的是苹果酸穿梭途径,所以一分子葡萄糖完全被氧化为 6 CO_2,共生成 34 分子 ATP,其中通过氧化磷酸化生成 28 分子 ATP,占总生成 ATP 的 82.35%(28/34)。通过底物水平磷酸化生成 6 分子 ATP,占 17.65%(6/34)。

10. 细胞色素 *c* 游走于电子传递链中的复合物Ⅲ和复合物Ⅳ之间,接收来自复合物Ⅲ的电子,然后负责将电子传递给复合物Ⅳ。细胞色素 *c* 与线粒体膜的结合并不紧密,很容易在细胞分级分离过程中丢失,这个蛋白在大多数有氧生物中都非常相似,所以实验中可用任一来源的细胞色素 *c*,并不影响实验结果。

11. 摄取大量代谢燃料(糖、脂肪和蛋白质)的鼠的氧化代谢率比较高,因此产生的氧自由基比摄食较少而氧化代谢率低的鼠更多。摄食量大的鼠的氧化损伤会逐渐累积,因此,它死得会早一些。

17 光合作用

1. (a) 是的。当 DCMU 阻断了电子流时,处于 $P680^*$ 状态的 PSⅡ将不能被重新氧化为 $P680^+$ 态,它是接收来自 H_2O 的电子的受体。如果 H_2O 不能被 $P680^+$ 氧化,也就没有 O_2 产生。在缺少经由细胞色素 *bf* 的电子流时,就没有跨膜的质子转移。没有 pH 梯度也就将没有光合磷酸化(ATP 合成)。

(b) 用于 PSⅡ的外部电子受体将使得 $P680^*$ 重新氧化为 $P680^+$,也将恢复 O_2 的产生。然而没有电子流经细胞色素 *bf*,也就没有 ADP 的磷酸化,因此 ATP 合成将停止。

2. 在循环电子传递过程中,被还原的铁氧还蛋白将它的电子通过细胞色素 *bf* 复合物返回给 P700。当这些电子再经由 PSⅠ循环时,通过细胞色素 *bf* 产生的质子梯度梯度驱动 ATP 合成。然而不会有 NADPH 生成,因为没有来自水的净电子流向铁氧还蛋白。也没有 O_2 生成,因为 PSⅡ(生成 O_2 的部位)没有参与循环电子传递。

3. 黑暗中的 Rubisco 没有活性。只有光合作用处于活跃状态才能进行葡萄糖合成,所

以除了光之外没有什么可以加到黑暗中的叶绿体悬液来激活 Calvin 循环。

4. (a) 在 C_4 植物中,为固定每一个 CO_2,磷酸丙酮酸二激酶反应消耗 2ATP 当量(因为 PP_i 水解为 $2P_i$)。因此,C_4 植物每合成 1 分子葡萄糖所需要的 ATP 要比 C_3 植物需要的多 12ATP。

(b) 尽管在固定 CO_2 过程中,C_4 植物需要的 ATP 要比 C_3 植物多,但由于 C_4 植物将光呼吸降至最低,所以 C_4 植物利用光能由 CO_2 合成糖要比 C_3 植物效率更高。

5. (a) 当外部 pH 上升到 8.0 时,基质 pH 也会快速上升,但由于类囊体膜对质子是相对不通透的,起始腔内 pH 维持在较低水平。跨膜的 pH 梯度通过质子经 ATP 合酶转移驱动 ATP 合成。

(b) 质子通过 ATP 合酶由腔内转移至基质,驱动 ATP 合成。当跨膜的 pH 梯度降低至不足以驱动 ADP 磷酸化时,ATP 合成停止。

6. (a) Rubisco 是世界上最丰富的蛋白质,是光合作用的主要催化剂。光合作用是生物维持生命所必需的基本手段,没有 Rubisco 就等于世界没有食物供给了。

(b) 光呼吸是个浪费核酮糖-1,5-二磷酸,消耗光反应生成的 NADPH 和 ATP 的过程,因此极大地减少了粮食的产量。高达 20%～30%光合作用中固定的碳都消失在光呼吸中。之所以造成这一结果是由于 Rubisco 缺少特异性。另外,Rubisco 的催化活性还很低($K_{cat} \approx 3s^{-1}$)。无特异性和低活性使得 Rubisco 又获得了相对来说不称职和低效率酶的称号。

7. 当 CO_2 相对较少时,C_4 植物在其叶肉细胞中可浓缩 CO_2,具有优势。然而,这个过程需要消耗 2 个等价的 ATP。因此,当 CO_2 充足时,能量效率高的 C_3 植物具有优势。因此,大气 CO_2 浓度升高更有利于 C_3 植物。

8. 在玉米中 CO_2 固定是通过 C_4 途径进行的。在该途径中磷酸烯醇式丙酮酸快速羧化为草酰乙酸(某些途径经转氨生成天冬氨酸)和还原为苹果酸。然后苹果酸进入维管束鞘细胞后经脱羧生成的二氧化碳才进入 Calvin 循环,所以光照时间长后稳定的产物主要是 3-磷酸甘油酸。

9. (a)合成一分子丙糖磷酸需要 9 分子 ATP 和 6 分子 NADPH。由于 2 分子丙糖磷酸可合成 1 分子葡萄糖,所以葡萄糖合成需要 18 分子 ATP 和 12 分子 NADPH,(b)将 1 分子葡糖-1-磷酸整合到淀粉还需要 1 分子 ATP(1 分子葡糖-1-磷酸转化为 ADP-葡糖时),所以总共需要 19 分子 ATP 和 12 分子 NADPH。

10. 沙漠中的这些植物通过景天酸代谢(CAM)在夜间吸收 CO_2,CO_2 与磷酸烯醇式丙酮酸反应生成苹果酸。早晨,由于大量苹果酸积累导致叶子带有酸味。白天气孔关闭,夜间积累的苹果酸通过暗反应转化为丙酮酸和 CO_2,因此叶子酸性减弱,变得无味。到了傍晚,所有的苹果酸都被消耗了,叶子呈弱碱性而有苦味。

18 脂代谢

1. (a) 为了进行 β-氧化,需要肉碱将酰基 CoA 由胞质转运到线粒体基质中,由于肉碱缺乏脂肪酸转运受到抑制,切断了脂肪供给肌肉工作的能量。在肌细胞中过量的酰基 CoA 被转换为三酰甘油。

(b) 由于转运糖酵解产物丙酮酸到线粒体进一步氧化不需要肉碱,所以不会影响肉碱缺乏的个体代谢肌糖原。

2. (a) 油酸有一个 *cis*-Δ^9 双键，需要烯酰 CoA 异构酶。

(b) 花生四烯酸在两个奇数碳（Δ^5，Δ^{11}）和偶数碳（Δ^8，Δ^{14}）存在 *cis* 双键，所以氧化需要 2 个烯酰 CoA 异构酶和 2，4-二烯酰 CoA 还原酶。

(c) C17 脂肪酸在偶数碳（Δ^6）含有 1 个 *cis* 双键，所以氧化需要 2，4-二烯酰 CoA 还原酶，此外还需要 3 个酶将产物丙酰 CoA 转化为琥珀酰 CoA：丙酰 CoA 羧化酶、甲基丙酰 CoA 消旋酶和甲基丙酰 CoA 变位酶。

3. 当我们饮食中的三酰甘油被摄入后，饮食中脂的水解主要发生在小肠中。胰脂酶催化三酰甘油的 C-1 位和 C-3 位的水解，生成游离的脂肪酸和 2-单酰甘油。这些分子以胆盐微团转运到肠中，在那里它们被肠细胞吸收。如果胰脂酶被抑制，饮食中的三酰甘油就不能被吸收，没被吸收的三酰甘油将通过消化道被排泄掉。

4. 摄入的乙醇首先被转化为乙醛，然后变为乙酸。人类只能利用乙酸产能，或将其转化为脂肪和其他脂类。肝脂肪堆积可导致脂肪肝。

5. (a) 脂肪在糖的火焰中燃烧，没有糖，就缺少添补途径补充柠檬酸循环中的成分。所以只食用脂肪，来自脂肪酸降解的乙酰 CoA 就将堆积。

(b) 来自丙酮的气味。

(c) 奇数碳脂肪酸会生成丙二酰 CoA，可被转化为柠檬酸循环中间物——琥珀酰 CoA，起到补充循环中间物的作用和消除口臭。

6. 催化 *L*-甲基丙二酸单酰 CoA 转化为琥珀酰 CoA 的甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶需要维生素 B_{12}，如果缺乏维生素 B_{12}，当饮食中消化了大量奇数碳脂肪酸时，将会有 *L*-甲基丙二酸单酰 CoA 积累。

7. 大量奶摄入意味着婴儿断奶前是脂肪提供主要的热量消耗。脂肪酸氧化产生大量的乙酰 CoA，部分乙酰 CoA 在肝脏组织中转化为酮体。酮体和葡萄糖一样，都是水溶性的，易于转运。而且琥珀酰 CoA 含量丰富，所以酮体可作为燃料支持婴儿新陈代谢及其发育。

8. 由于线粒体 CoA 库比较小，缺少 CoA 不能使 β-氧化正常运作，所以 CoA 必须经由乙酰 CoA 形成酮体再循环生成，这可使 β-氧化正常运作。

9. (a) 被标记的碳原子仍保留在 $H^{14}CO_3^-$ 中，没有标记物进入十六烷酸中，尽管 $H^{14}CO_3^-$ 被整合入丙二酰 CoA，但同一碳原子在酮酰-ACP 合酶的每一轮循环反应中又以 CO_2 形式释放了。

(b) 所有的偶数碳原子都被标记了。除了变成棕榈酸的 C-15 和 C-16 之外，乙酰 CoA 转化为丙二酸单酰 CoA，然后转化为丙二酸单酰-ACP，随着缩合时释放出 CO_2 后被整合到生长着的脂肪酸链中。

10. 吃刺激糖（糖酵解和丙酮酸脱氢酶）和脂肪（脂肪酸氧化）代谢产生乙酰 CoA，通常增加的乙酰 CoA 会导致丙二酸单酰 CoA 浓度上升，转而抑制食欲。通过抑制脂肪酸合酶，C75 可防止因合成脂肪酸而用掉丙二酸单酰 CoA，从而提高丙二酸单酰 CoA 的水平，并进一步抑制食欲。

19　氨基酸代谢

1. 在天冬氨酸转氨酶催化下，^{15}N 标记的氨基由 Asp 转移给 α-酮戊二酸生成 ^{15}N 标记 Glu。许多其他转氨酶又用 ^{15}N 标记 Glu 作为 α-氨基供体合成许多氨基酸，所以 ^{15}N-Glu 中

的^{15}N原子会很快进入其他氨基酸中(Lys和Thr除外)。

2. 转氨作用产生了丙酮酸和谷氨酸。加入乳酸脱氢酶使丙酮酸转变成乳酸,同时将NADH氧化成NAD^+。由于NADH(不是NAD^+)在340nm处有吸收峰,我们可以通过测量该处吸光值的下降来跟踪反应的进行。

3. 在肌肉中不能进行尿素循环,所以氨基酸脱下的氨不能转化为尿素。由于高浓度的氨是有毒的,动物要把它转化为其他产物来处理。在第1条途径中,通过谷氨酰胺合成酶氨被整合到谷氨酰胺。然后谷氨酰胺可以转运到肝或肾。第2条是葡糖-丙氨酸循环。丙酮酸接收来自脱氨作用的氨基生成丙氨酸,然后被转运到肝,在肝内被脱氨重新生成丙酮酸。氨基被用来尿素合成,而丙酮酸可被转化为葡萄糖。

4. 所有柠檬酸循环中间物都可形成草酰乙酸,然后草酰乙酸在磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化下脱羧并被磷酸化生成磷酸烯醇式丙酮酸,磷酸烯醇式丙酮酸经糖异生途径生成葡萄糖。

5. (a) 禁食导致低血糖,当喂以实验饮食时会导致生糖氨基酸的快速分解。

(b) 氧化脱氨导致氨浓度的升高,精氨酸(尿素循环中的中间代谢物)缺乏阻断了氨转化为尿素的通路,实验条件下无法合成足够的精氨酸。实验表明精氨酸对猫来说是必需氨基酸。

(c) 鸟氨酸通过尿素循环可转化为精氨酸。

6. (a) 缺少苯丙氨酸羟化酶;苯丙氨酸到酪氨酸的通常代谢途径被阻断造成苯丙氨酸、苯丙酮酸堆积,此病称之为苯酮尿症。最好治疗方法是降低苯丙氨酸摄入,如喂食没有苯丙氨酸的奶粉。

(b) 酪氨酸是黑色素的前体分子,但病人由于缺乏酪氨酸酶不能合成黑色素,头发缺少黑色素故呈灰白色。

(c) 阿斯巴甜是一个二肽酯,水解可以生成*L*-天冬氨酸和*L*-苯丙氨酸。苯丙氨酸浓度高会加重苯丙酮尿症。

7. 分泌的尿素被^{15}N标记,且两个氨基都被标记了。因为^{15}N-Ala能够通过转氨使草酰乙酸接收氨基转换成^{15}N-Asp,以及通过氧化脱氨生成游离的$^{15}NH_4^+$,可以导致^{15}N标记的氨甲酰磷酸的生成。由于尿素中的2个氨基分别来自氨甲酰磷酸和Asp,所以尿素中的2个氨基就都是^{15}N标记的了。

8. 消耗高蛋白食物的人用氨基酸作为代谢燃料。因为氨基酸碳骨架可以转化成生酮或生糖化合物,氨基要以尿素形式被处理掉,必然导致尿素循环流量增加。在饥饿时,蛋白质(主要来自于肌肉)降解提供用于糖异生的前体。来自于蛋白质降解生成的氨基酸的氮必须要消除,这也需要一个高活性水平的尿素循环。

9. 先算出1分子尿素中氮含量的百分比,尿素相对分子质量为60,其中氮原子有2个(28),所以40g尿素中的氮含量为28÷60×40=18.7(g),因此蛋白质摄入量为18.7÷16%=117(g)。

蛋白质提供的能量占能量总需求的百分比:(117×14)÷10 000≈16.4%

10. 丙氨酸和谷氨酰胺分别担负着将大量氨基从肌肉和其他非肝组织转运到肝的特殊任务,所以需要的量远比其他氨基酸多得多。

20 核苷酸代谢

1. *D*-核糖是以α-*D*-吡喃核糖、α-*D*-呋喃核糖、β-*D*-吡喃核糖和β-*D*-呋喃核糖的平衡复

合物存在的。这些立体异构形式通过开链形式彼此可相互转换。

2.（a）在嘌呤从头合成的过程中，来自于 Gln 的被标记的酰胺氮原子出现在嘌呤环 N-3 和 N-9 位置上；

（b）以 2-[^{14}C]-Gly 为原料从头合成嘌呤，标记出现在 IMP 的嘌呤环 C-5。

3. 需要 7ATP 当量。当合成 PRPP 时，1 个 ATP 被切下 AMP。在 IMP 生物合成途径的第 1 步，PRPP 的焦磷酸被释放，然后被水解为 2P_i，这是第 2 个 ATP，另外 5ATP 消耗在第 2、4、5、6 步和 7 步反应中。

4. 需要 4ATP 当量。一个 ATP 用于由核糖-5-磷酸合成 PRPP。氨甲酰磷酸合成需要 2ATP。另一个 ATP 当量消耗在第 5 步，当 PP_i 水解为 2P_i 时。

5. 病因主要是尿酸的过量生产（是正常的 6 倍）和嘌呤的从头生物合成过度（是正常值的 200 倍）。因为 HGPRT 遗传缺陷使得 PRPP 浓度增加，高水平的 PRPP 会导致嘌呤和嘧啶的过量生产，促使嘌呤和嘧啶从头合成途径活跃，而高水平的嘌呤又会增强它的分解代谢，结果导致尿酸的堆积，尿酸会引起肾结石和痛风。

6. 加入谷胱甘肽有效，而加入碘乙酰胺无效。因为核糖核苷酸还原需要还原型的核糖核苷酸还原酶。谷胱甘肽作为一种抗氧化剂，它的加入可以使酶稳定在其还原状态上，并对酶的中心基团——巯基起保护作用。而碘乙酰胺是酶的不可逆抑制剂，它可与巯基发生共价结合，所以该试剂的加入会使酶失活。

7. 癌细胞的快速分裂依赖于 DNA 的快速合成，而 DNA 的合成又受到 dTMP 可利用性的限制，氟尿嘧啶在细胞中被转化成氟化脱氧尿苷酸（F-dUMP），不可逆地抑制 dTMP 的合成，等于阻断了 DNA 的合成，降低了细胞分裂和组织生长速度。由于这种化疗药物在杀死快速增殖的癌细胞的同时也杀死头发的毛囊细胞，所以头发会脱落。

8. 因为培养基中含有突变细胞无法合成的胸苷，所以这些细胞能够生长。正常的细胞能够不断合成它们自己的胸苷，然后将它们有限的四氢叶酸转换为二氢叶酸。氨甲蝶呤抑制了二氢叶酸还原酶，所以四氢叶酸不能再生。没有四氢叶酸供给核苷酸和氨基酸的合成，细胞就死亡了。

9. 谷氨酰胺-PRPP 酰胺转移酶是从头合成 IMP 中的第 1 个酶和主要的调节位点。人体中 PRPP 既是底物，又是正调节剂。PRPP 的细胞水平增加由于增加了 PRPP 合成酶的活性，因此将增强酰胺转移酶的活性。这将增加 IMP、和其他嘌呤核苷和核苷酸的合成。嘌呤核苷酸过量生成和随后的降解将导致痛风特有的尿酸水平升高。

10. 嘌呤和嘧啶不是重要的能源。脂肪酸和糖的碳原子可以被氧化产生 ATP，但对于含氮的嘌呤和嘧啶不存在较能产能的途径。然而，当次黄嘌呤转化为尿酸时产生的 NADH 通过氧化磷酸化可以直接产生 ATP。尿嘧啶和胸腺嘧啶的降解可分别获得乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA，它们经柠檬酸循环代谢可产生 ATP。

索　　引

G

H

J

K

L

M

N

P

Q

R

S

T

W

X

Y

Z

参 考 文 献

[1] CHRISTOPHER K,MATHEWS K E VAM HOLDE, et al. Biochemistry[M]. 4th ed. New York: Pearson Education,2013.

[2] LAURENCE A,MORAN H. HORTON R,et al. Principles of Biochemistry[M]. 5th ed. New York: Pearson Education,2012.

[3] CAMPBELL M K,FARRELL S O. Biochemistry[M]. 6th ed. Belmont : Thomson Learning,2009.

[4] VOET D,VOET J G,PRATT C W. Fundamentals of Biochemistry[M]. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons,Inc. ,2008.

[5] GARRETT R H,GRISHAM C M. Biochemistry[M]. 3rd ed. Belmont: Harcourt, 2005.

[6] 静国忠. 基因工程及其分子生物学基础——分子生物学基础分册[M]. 2 版. 北京:北京大学出版社,2009.